

COMPARAÇÃO DA FORMAÇÃO DE CISTOS TECIDUAIS, PESO DE ÓRGÃOS E CINÉTICA DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM *Toxoplasma gondii*¹

João Marco Pansera Bottin²

Edson Assis Bastos Júnior²

Thays Mizuki Lucas³

Thiago de Oliveira Zamprogna³

Rodrigo Costa da Silva⁴

Helio Langoni⁵

Aristeu Vieira da Silva⁶

RESUMO

Grupos de seis camundongos Swiss albinos, de 30 dias de idade, fêmeas, foram inoculados com 20 cistos teciduais das cepas ME49 (genótipo II): G1 e G2 e M7741 (genótipo III): G3 e G4, vias oral (G1 e G3) e subcutânea (G2 e G4), e não inoculado (G5). Os animais foram observados diariamente para verificação de alterações clínicas, e submetidos à eutanásia aos 60 dias pós-inoculação. Foram pesados o fígado, baço, rins, pulmões, coração e cérebro, que foram macerados para contagem de cistos. Amostras de sangue foram coletadas a cada 15 dias e o soro submetido ao método de aglutinação direta (MAD) para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*. Houve diferença expressiva no peso dos órgãos dos animais infectados em relação ao grupo controle, principalmente quando considerada a via de infecção oral, independente da cepa inoculada. A cepa M7741 não formou cistos cerebrais visíveis à microscopia óptica, enquanto que para a cepa ME49 houve maior número de cistos na infecção oral, em comparação com a via subcutânea. Nenhum soro de camundongos do grupo controle, e todos os outros de animais dos grupos experimentais, apresentaram anticorpos anti-*Toxoplasma*, demonstrando a sensibilidade e especificidade do MAD para esta espécie. Apesar das curvas de anticorpos dos quatro grupos inoculados diferirem, em geral houve detecção de anticorpos a partir de 14 dias após a inoculação (DPI), pico aos 28 ou 42 DPI e queda ou manutenção do título de anticorpos aos 56 DPI.

Palavras-chave: *Toxoplasma*; camundongo; infecção experimental; cistogênese; cinética de anticorpos; peso de órgãos.

¹ Entidade financiadora: Universidade Paranaense

² Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária, UNIPAR – Umuarama – PR; participante do Programa Institucional de Iniciação Científica – PIC/UNIPAR; joabottin@hotmail.com; dredsonbastos@hotmail.com

³ Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária, UNIPAR – Umuarama – PR; participantes do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/UNIPAR; thaysmizuki@yahoo.com.br; thiago_zamprogna@hotmail.com

⁴ Médico Veterinário, Acadêmico/doutorando do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Botucatu – Núcleo de Pesquisa em Zoonoses – NUPEZO silva_rcd@yahoo.com.br

⁵ Médico Veterinário, Professor Titular do Curso de Medicina Veterinária, UNESP, Campus Botucatu, Coordenador do NUPEZO; hlangoni@fmvz.unesp.br

⁶* Médico Veterinário, Coordenador do Mestrado em Ciência Animal, Universidade Paranaense – UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n – Centro – CEP 87.502-410 – Umuarama – PR Fone (44) 36212828, ramal 1522 – Fax (44) 36212885 – aristeu@unipar.br.

COMPARISON OF TISSUE CYSTS FORMATION, ORGAN WEIGHT GAIN AND KINETICS OF ANTIBODIES IN SWISS MICE INFECTED WITH *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

Groups of six Swiss albino mice, 30 days of age, females, were inoculated with 20 tissue cysts of strains ME49 (genotype II): G1 and G2 and M7741 (genotype III): G3 and G4), by oral (G1 and G3) or subcutaneous (G2 and G4) routes, and not inoculated (G5). Animals were observed daily for clinical changes and were killed 60 days after inoculation. The liver, spleen, kidneys, lungs, heart and brain were weighted, and the brain was macerated for cyst counting. Blood samples were collected every 15 days and serum samples were submitted to modified agglutination test (MAT) for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. There was a significant difference in the weight of the organs of infected animals when compared with the control group, mainly for the oral inoculation, no matter the strain used. Strain M7741 did not produce cysts visible in light microscopy, whereas strain ME49 showed a greater number of cysts in oral infection compared with the subcutaneous infection. No serum sample of the control group and all serum samples of the experimental groups showed antibodies anti-*Toxoplasma*, demonstrating the sensitivity and specificity of MAT for this species. Although antibody profiles of the four groups inoculated were different, antibody detection generally occurred starting 14 days post-inoculation (DPI), peaked at 28 or 42 DPI and antibody titers dropped or were maintained at 56 DPI.

Key-words: *Toxoplasma*; mouse; experimental infection; cystogenesis; antibody kinetics; organ weight.

COMPARACIÓN DE LA FORMACIÓN DE QUISTES, PESO DE LOS ÓRGANOS Y DE LA CINÉTICA DE ANTICUERPOS EN RATONES SWISS INFECTADOS CON *Toxoplasma gondii*

RESUMEN

Grupos de seis ratones Swiss albinos, de 30 días de edad, hembras, fueran inoculados con 20 quistes tejiduales de las cepas ME49 (genotipo II): G1 e G2 y M7741 (genotipo III): G3 e G4, por las vías oral (G1 e G3) o subcutánea (G2 e G4), y no inoculado (G5). Los animales fueran observados diariamente para verificación de alteraciones clínicas, e sometidos a eutanasia a los 60 días después de la inoculación. Fueran pesados el hígado, bajo, riñones, pulmones, corazón y cerebro, que fue macerado para contaje de quistes. Muestras de sangre fueran colectadas a cada 15 días e el suero sometido al método de aglutinación directa (MAD) para detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*. Hubo diferencia expresiva en el peso de los órganos de los animales infectados en relación a el grupo controle, principalmente cuando considerada la vía de infección oral, independiente de la cepa inoculada. La cepa M7741 no formo quistes cerebrales visibles a microscopia óptica, y para la cepa ME49 hubo mayor número de quistes en la infección oral en comparación con la vía subcutánea. Ninguno suero de ratones del grupo controle, y todos los soros de animales de los grupos experimentales, presentaran anticuerpos anti-*Toxoplasma*, demostrando la sensibilidad y especificidad del MAD para esta especie. Mientras las curvas de anticuerpos de los cuatro grupos inoculados diferiré, en general hubo detección de anticuerpos a partir de los 14 días pos la inoculación (DPI), pico a los 28 o 42 DPI y queda o manutención del título de anticuerpos a los 56 DPI.

Palabras-clave: *Toxoplasma*; ratón; infección experimental; cistogênese; cinética de anticuerpos; peso de los órganos.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais comuns, causando também perdas econômicas significativas à pecuária. Modelos experimentais de toxoplasmose têm sido desenvolvidos em animais de laboratório para estudar variados aspectos desta enfermidade. Como observado em outras doenças parasitárias, a patologia da infecção pelo *T. gondii* resulta da interação entre fatores parasitários e do hospedeiro. Isto reforça as dificuldades em comparar os dados, algumas vezes discordantes, obtidos por diferentes instituições, uma vez que geralmente os modelos experimentais variam em muitos aspectos: a linhagem do animal, a via de infecção, a cepa de *T.gondii* utilizada, as condições de manutenção e o número de passagens do parasita (1).

Após a ingestão pelos camundongos de cistos teciduais ou bradizoítos, estes penetram nos enterócitos, invadindo vários tipos celulares na lâmina própria, e dividem-se já no estágio de taquizoítos às 18 horas pós-infecção. Os parasitas disseminam-se aos órgãos extraintestinais, com a parasitemia ocorrendo das 24 a 48 horas após a infecção. A bioprova e o exame histopatológico demonstram que cistos teciduais formam-se aos seis dias após a infecção no cérebro e outros tecidos (2, 3).

Este estudo investigou a formação de cistos teciduais cerebrais em camundongos, a partir da inoculação de cistos teciduais de cepas geneticamente distintas, por duas vias de inoculação, verificando também a alteração no peso dos órgãos e a cinética de anticorpos séricos.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Foi realizado um estudo experimental aleatorizado, em que grupos de seis camundongos albinos da linhagem Swiss Webster, foram infectados com duas cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*, por duas vias de inoculação. Estes animais foram acompanhados durante aproximadamente dois meses, avaliando-se a produção de anticorpos séricos pelo método de aglutinação direta – MAD, em diluições sucessivas na razão dois, de 1:10 até 1:51.200 (4), os efeitos da infecção sobre o peso dos órgãos dos animais e a formação de cistos teciduais cerebrais. O protocolo desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação da Universidade Paranaense.

Cepas de *Toxoplasma gondii*

Foram utilizadas as cepas ME49 (genótipo II) e M7741 (genótipo III) de *Toxoplasma gondii*, no estágio de cisto tecidual, cedidas pelo Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da Universidade Paranaense – UNIPAR, Campus Sede. Os cistos teciduais foram obtidos a partir de macerado de cérebros de camundongos previamente inoculados com cistos teciduais via oral, de manutenção permanente na UNIPAR, segundo o protocolo de Dubey; Beattie (5).

Inoculação, manutenção e observação das unidades experimentais

Os grupo G1 e G2 receberam 20 cistos teciduais de *Toxoplasma* da cepa ME49, vias oral e subcutânea, respectivamente. Os grupos G3 e G4 receberam 20 cistos teciduais da cepa M7741, pelas mesmas vias. O grupo G5 não foi inoculado, permanecendo como controle. Os

camundongos dos grupos G3 e G4 receberam tratamento com solução de sulfadiazina pela água de bebida a partir do quarto dia após inoculação até o décimo quinto, para indução da formação de cistos teciduais (6). Após a inoculação os camundongos foram mantidos na sala de manutenção do Laboratório de Farmacologia, UNIPAR, Campus Umuarama – Sede, com controle de temperatura e ventilação, fotoperíodo de 12/12 horas, água e ração *ad libitum*, por dois meses. A observação dos animais e a coleta de dados foram realizadas uma vez ao dia, sendo anotados quaisquer sinais de alteração comportamental ou clínica.

Coleta de amostras

Foram realizadas cinco coletas de amostras de sangue dos animais com intervalo de 14 dias, pela punção do plexo retroorbitário. A seguir eram centrifugadas, e o soro obtido recolhido em microtubos plásticos de 0,5 mL, e congelados a -20°C até a execução do MAD. Ao final de dois meses os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia por deslocamento crânio-cervical, pesados, e fixados em decúbito dorsal, para procedimento das aberturas peritoneal, torácica e craniana. Foram coletados o baço, fígado, rins, coração, pulmões e cérebro, que foram pesados. Para a evidenciação da formação de cistos teciduais, o cérebro de cada camundongo foi macerado com 0,5 mL de solução salina, e 25 μl da suspensão de tecido foi examinada por microscopia óptica entre lâmina e lamínula para contagem dos cistos teciduais.

Análise dos resultados

O peso final dos animais foi expresso como média \pm erro-padrão da média e comparado entre os grupos pela análise de variância para experimento inteiramente aleatorizado (ANOVA-EIA). O peso dos órgãos foi dividido pelo peso dos camundongos, obtendo-se então os índices órgão-somáticos, e expressos como média \pm erro-padrão da média e comparado entre os grupos (ANOVA-EIA), sendo a titulação de anticorpos transformada em logaritmo. O número de cistos teciduais cerebrais foi comparado entre os grupos pelo método de Mann-Whitney. Em todas as análises considerou-se um nível de significância de 5% (7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que não houve formação, nos grupos G3 e G4, inoculados com a cepa M7741 (tipo III), de cistos cerebrais detectáveis ao exame pela microscopia óptica. Uma hipótese para a não formação de cistos cerebrais nestes grupos é de que a dose de sulfadiazina utilizada para o tratamento tenha inibido a cistogênese no cérebro. Segundo Freire (8), a administração na água de 150 mg/L de sulfadiazina a partir do quarto dia pós infecção é eficaz para controlar a fase aguda pela cepa M7741 e induzir a cistogênese. Denota-se, então, a necessidade de se testar outras doses da droga para verificar a formação de cistos teciduais nesta cepa.

Na contagem de cistos teciduais no cérebro de camundongos inoculados com a cepa ME49 (tipo II) de *Toxoplasma gondii*, pela via oral (G1) obteve uma produção mediana de 600 cistos cerebrais, enquanto que a subcutânea (G2) mediana de 140 cistos cerebrais. Pela Figura 1, observa-se que entre 25% e 75% dos camundongos de G1 apresentaram contagem entre 240 a 640 cistos, enquanto que o mesmo percentual de G2 contagem de 60 a 190 cistos cerebrais ($p < 0,05$). Dubey (3) comparando as vias oral e subcutânea na formação de cistos cerebrais da cepa ME49, a mesma utilizada neste experimento, obteve maior produção de cistos cerebrais nos camundongos inoculados pela via oral, com inóculos de 1 a 10^6

bradizoítos livres. A média variou de 566 a 1340 cistos, naqueles inoculados com 10^2 a 10^6 parasitos, enquanto que com as mesmas concentrações, via subcutânea, 340 a 740.

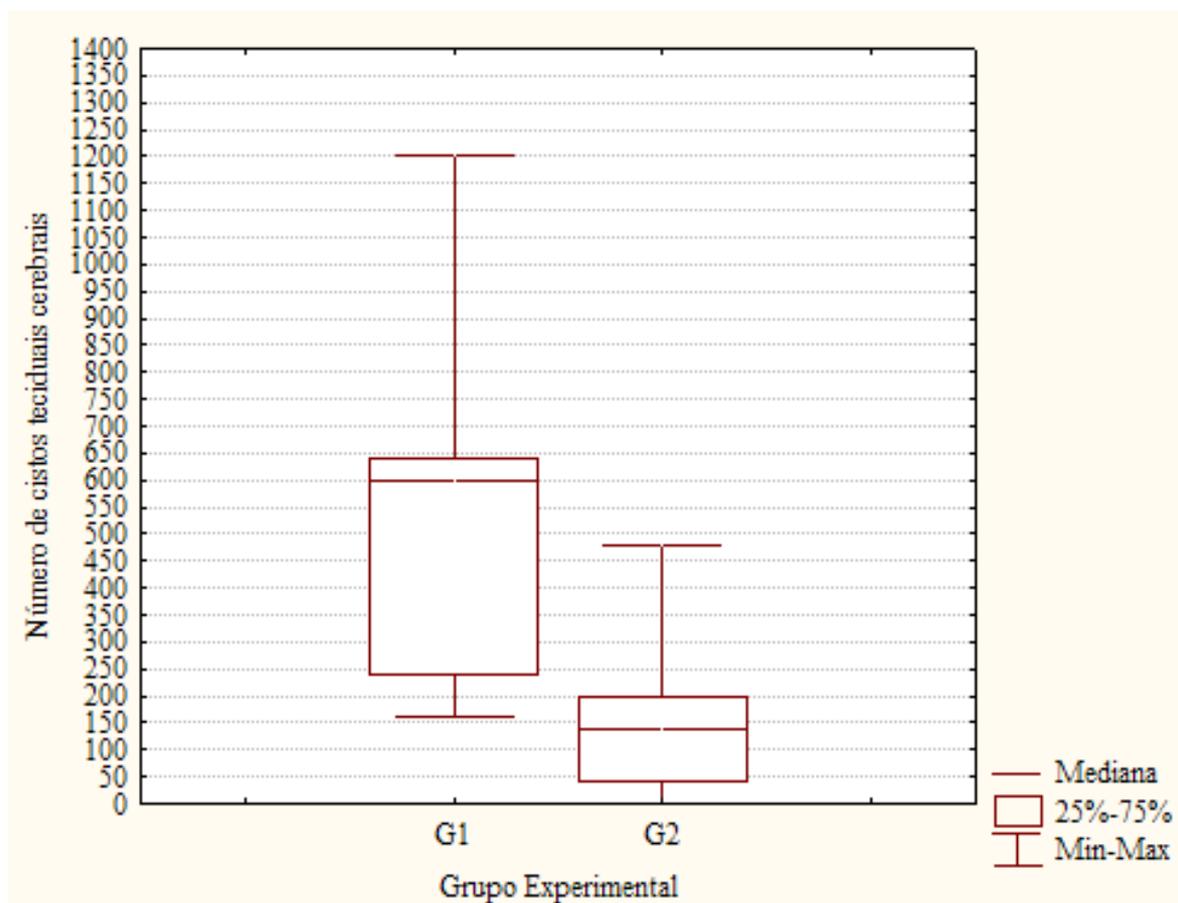


Figura 1. Estatísticas descritivas da contagem de cistos teciduais em cérebro de camundongos inoculados com 20 cistos teciduais de uma cepa tipo II de *Toxoplasma gondii*, vias oral (G1) ou subcutânea (G2). Umuarama, 2007.

A Figura 2 apresenta a média \pm erro-padrão do peso dos animais aos 60 dias após a inoculação. Comparando o grupo G1 que recebeu a cepa ME49, via oral, e o grupo controle, pode-se observar uma queda no peso dos animais durante o período de experimento. Apesar das médias dos demais grupos inoculados terem sido menores que a do grupo controle, estas diferenças não foram significativas ($p > 0,05$). Arsenijevic et al. (9) verificaram que camundongos Swiss Webster inoculados com a cepa ME49 apresentaram, nos primeiros 14 dias da fase aguda, aumento de metabolismo e perda de peso. Na avaliação da fase crônica, os camundongos apresentaram recuperação parcial de peso ou o mantiveram. Aparentemente, o aumento da atividade metabólica está associado com a elevação da oxidação lipídica, que é dependente da produção de $\text{INF-}\gamma$. Resultados semelhantes foram obtidos por Picard et al. (10), ao inocularem dez cistos da cepa ME49, pela via intraperitoneal, em camundongos Swiss Webster. Constataram uma perda de peso inicial de 27 a 30% em todos os camundongos e, até o 28º dia de observação, cerca da metade dos animais recuperaram aproximadamente 62% do peso, enquanto que o restante mantiveram-se em queda.

Na Figura 3 verifica-se os índices de massa de cada órgão. Independente da cepa e da via de inoculação utilizadas, todos os órgãos examinados tiveram aumento de massa em relação o grupo controle.

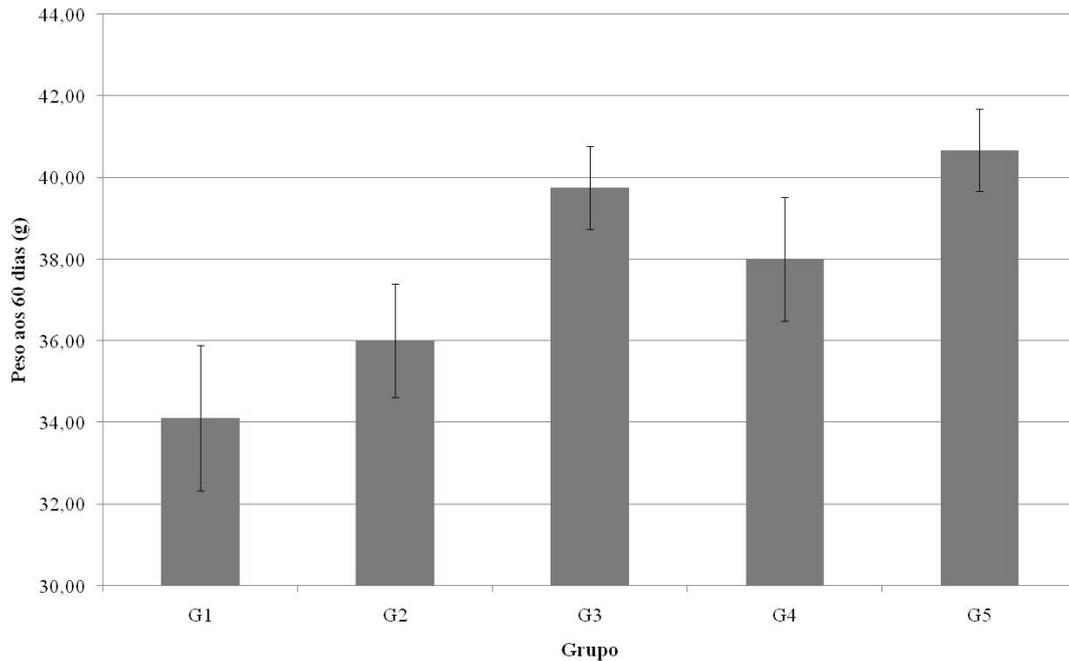


Figura 2. Média \pm erro-padrão do peso aos 60 dias de camundongos inoculados com 20 cistos teciduais de uma cepa tipo II (G1 e G2) ou tipo III (G3 e G4) de *Toxoplasma gondii*, vias oral (G1 e G3) ou subcutânea (G2 e G4), ou não inoculados (G5). Umuarama, 2007.

Comparando o índice de massa das duas cepas, observou-se que na ME49 o aumento, em geral, foi maior que os índices dos grupos inoculados com a M7741. Contudo, é importante ressaltar que os animais deste grupo receberam tratamento com sulfadiazina, podendo haver influência deste quimioterápico nas diferenças encontradas. Aliado à genética do parasito, a resposta individual às agressões causadas pelo parasito, como a intensidade da resposta inflamatória e a intensidade da resposta imunológica podem ter influenciado no aumento da massa dos órgãos avaliados.

Quanto às vias em estudo, os animais inoculados via oral apresentaram peso dos órgãos, maior do que aqueles via subcutânea. Uma possível explicação para este fato está na diferença das populações de células macrofágicas encontradas no tecido intestinal em comparação com a pele e subcutâneo. Uma maior população de células dendríticas no tecido subcutâneo poderia atuar como barreira à proliferação inicial do parasito, diminuindo o impacto sobre os órgãos afetados (11).

Sumyuen et al. (12) investigaram os estágios iniciais da infecção de camundongos com a cepa C de *T. gondii*, considerada avirulenta para este modelo. Os autores inocularam os camundongos via oral, com 20 cistos do parasito, fazendo a quantificação do mesmo no sangue, baço, placas de Peyer, fígado, pulmões e cérebro dos animais das 12 horas aos 72 dias após a infecção (DPI). Nenhuma alteração foi encontrada nos órgãos entre o dia 0 e o dia 3, quando então o baço e as placas de Peyer aumentaram de tamanho, entretanto com gradual retorno ao normal, no decorrer do experimento. Os pulmões permaneceram normais até dez DPI, quando então rapidamente aumentaram, e aos 14 dias apresentavam-se congestos e edematosos. Ao contrário, o exame do cérebro e do fígado não demonstrou alterações macroscópicas expressivas. Ressalta-se que, para os grupos G1 e G2, inoculados com uma cepa tida como pouco virulenta para camundongos, o aumento de peso do fígado e de baço foi significativo em relação àquele observado no grupo controle. Assim, a reação inflamatória à presença do parasito, mesmo em sua fase crônica, pode ter influenciado positivamente para o aumento de massa dos órgãos avaliados.

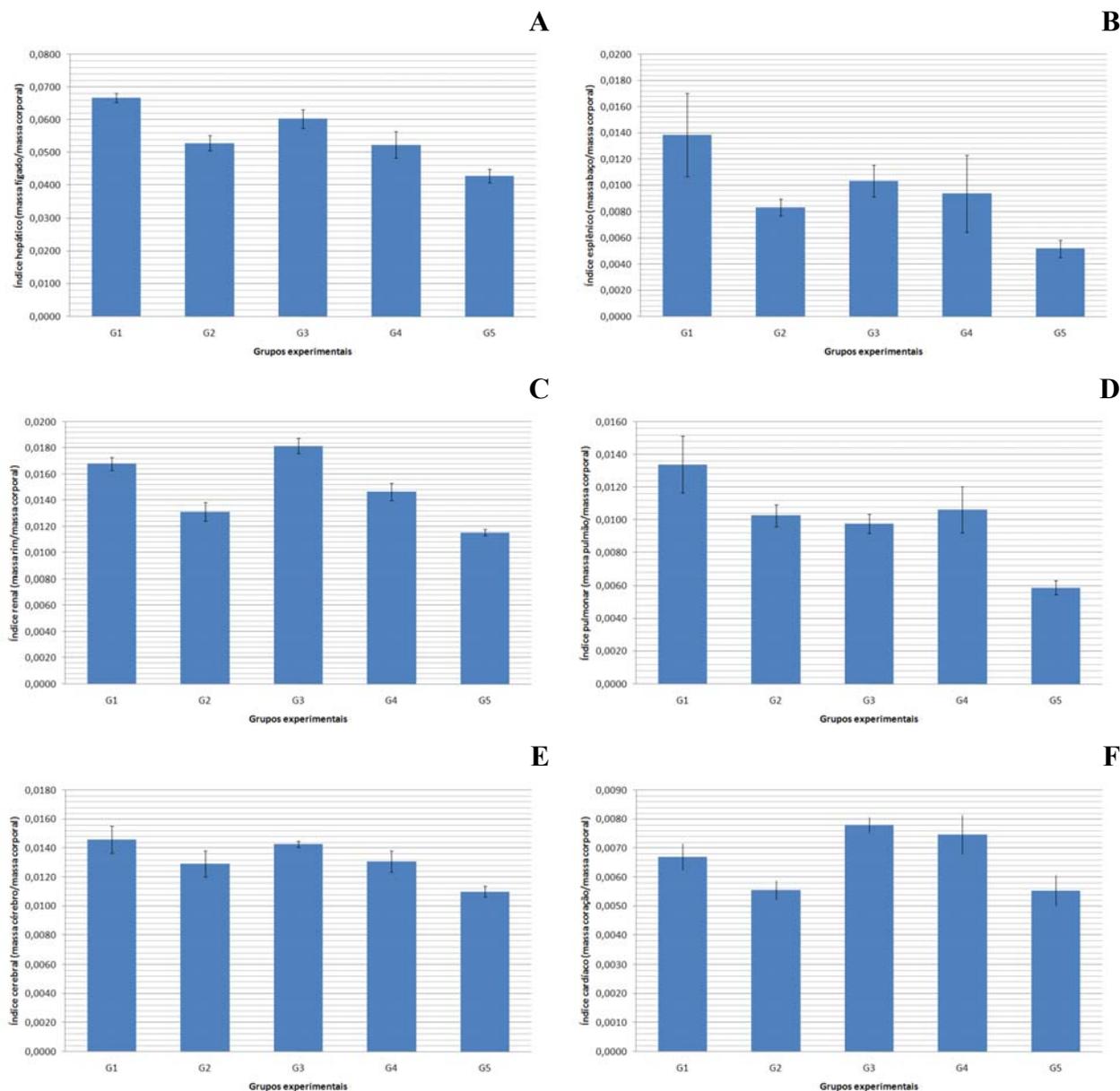


Figura 3. Média \pm erro-padrão dos índices hepático (A), esplênico (B), renal (C), pulmonar (D), cerebral (E) e cardíaco (F) de camundongos inoculados com 20 cistos teciduais de uma cepa tipo II (G1 e G2) ou tipo III (G3 e G4) de *Toxoplasma gondii*, vias oral (G1 e G3) ou subcutânea (G2 e G4), ou não inoculados (G5). Umuarama, 2007.

De acordo com a Figura 4 pode-se observar que a média dos títulos de anticorpos séricos dos animais inoculados com a cepa M349 (G1 e G2), foram maiores com relação aos animais inoculados com a cepa M7741 (G3 e G4). Nenhum camundongo do Grupo G5, controle, apresentou reações positivas ao exame de detecção de anticorpos séricos. Os resultados obtidos no grupo G2 (SC) são semelhantes aos encontrados no trabalho de Handman e Remington (13), que utilizaram a mesma via e a cepa C37, de virulência semelhante à ME49.

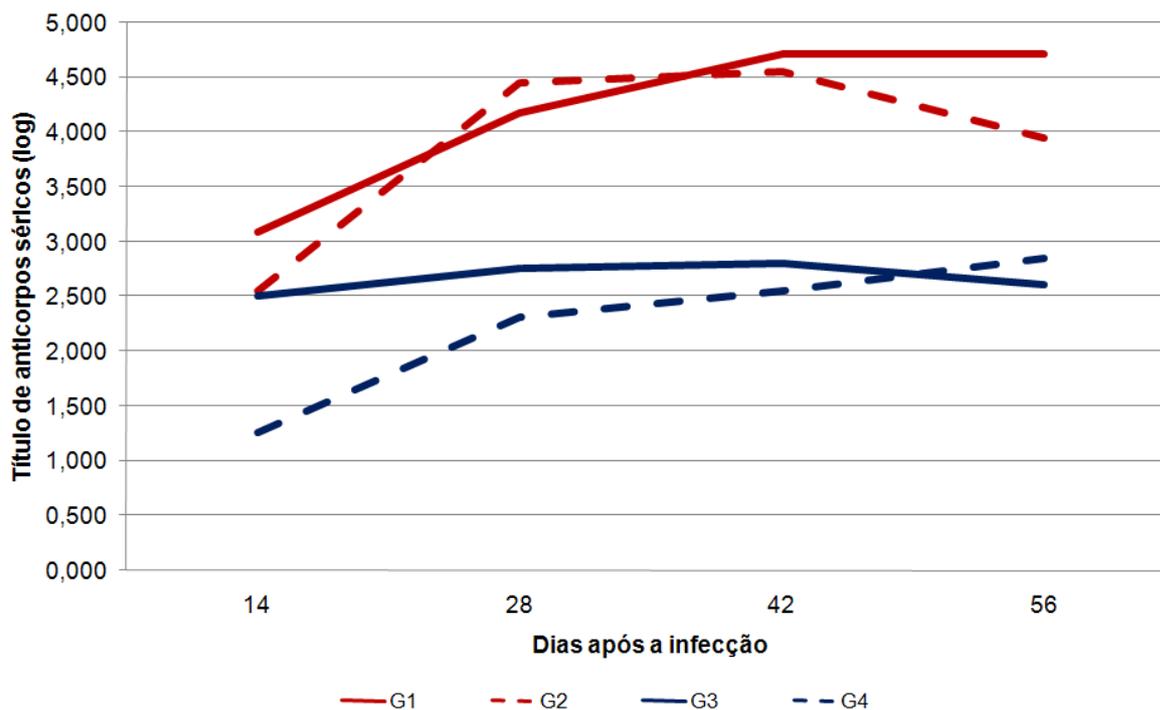


Figura 4. Média dos títulos de anticorpos séricos (log do título) de camundongos inoculados com 20 cistos teciduais de uma cepa tipo II (G1 e G2) ou tipo III (G3 e G4) de *Toxoplasma gondii*, vias oral (G1 e G3) ou subcutânea (G2 e G4), de acordo com os períodos após a infecção (DPI). Umuarama, 2007.

Os títulos de anticorpos foram mais elevados nos grupos G1 e G3, inoculados via oral, que nos inoculados via sub-cutânea. Uma possível multiplicação maior de parasitos, quando inoculados via oral, pode ser uma explicação para este comportamento, já observado em ratos infectados com diferentes concentrações de bradizoítos da cepa ME49 (14). Com relação à cepa M7741, nossos resultados são similares aos de Dubey e Frenkel (15).

CONCLUSÕES

- A infecção pelo parasito determinou alterações nos órgãos, principalmente na inoculação oral, sendo também, mais eficiente na produção de cistos cerebrais da cepa genótipo II;
- Camundongos inoculados com uma cepa genótipo II e não tratados, apresentaram títulos de anticorpos mais elevados que aqueles inoculados com o genótipo III e tratados com sulfadiazina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenadoria de Pesquisa e Iniciação Científica e à Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e da Pós-Graduação, da Universidade Paranaense, pela concessão das bolsas de Iniciação Científica e pelo suporte ao desenvolvimento do projeto de pesquisa. Ao acadêmico do curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense, Valdeci Messa, pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

1. Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol*. 1998; 90: 86-94.
2. Dubey JP. Bradyzoites-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*. 1997; 44: 592-602.
3. Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OCH, Blixt JA. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity and conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol*. 1997; 83: 870-82.
4. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*. 1980; 11: 562-8.
5. Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC Press; 1988. 220p
6. Villard O, Candolfi E, Ferguson DJP, Marcellin L, Kien T. Loss of oral infectivity of tissue cyst of *Toxoplasma gondii* RH strain to outbred Swiss Webster mice. *Int J Parasitol*. 1997; 27: 1555-9.
7. Triola MF. *Introdução a estatística*. Rio de Janeiro: LTC; 2005. 656p.
8. Freyre A. *Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis*. Montevideo: Universidad de La Republica; 1989. 332p.
9. Arsenijevic D, De Bilbao F, Giannakopoulos P, Girardier L, Samec S, Richard D. A role for interferon-gamma in the hypermetabolic response to murine toxoplasmosis. *Eur Cytokine Netw*. 2001; 12: 518-27.
10. Picard F, Arsenijevic D, Richard D, Deshaies Y. Response of adipose and muscle lipoprotein lipase to chronic infection and subsequent acute lipopolysaccharide challenge. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9: 771-6.
11. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11: 569-88.
12. Sumyen MH, Garin YJF, Derouin F. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. *J Parasitol*. 1995; 81: 327-9.
13. Handman E, Remington JS. Antibody responses to *Toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infect Immun*. 1980; 29: 215-20.
14. Da Silva AV, Langoni H. Kinetics of serum antibody in *Rattus norvegicus* experimentally infected with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Vet Zootec*. 2005; 12: 69-76.
15. Dubey JP, Frenkel JK. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J Parasitol*, 1973; 59: 505-12.

Recebido em: 05/06/2008

Aceito em: 04/08/2009