

# REDUÇÃO DO NÚMERO DE CAMUNDONGOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DE FORMAS INFECTANTES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* ATRAVÉS DE IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA

Gabriel Melo de Oliveira<sup>1</sup>

## RESUMO

A infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* no Laboratório de Biologia Celular/IOC é realizada através da obtenção da forma infectante (tripomastigotas sanguíneas) em camundongos. Em 2005, foram utilizados cerca de 250 animais por semana para alcançar o volume de  $70 \times 10^6$  parasitas/ml. De acordo com os princípios éticos descritos para reduzir o número de animais utilizados em ensaios científicos, elaboramos um protocolo de imunossupressão com ciclofosfamida. Nosso objetivo foi estabelecer um protocolo para redução do número de camundongos utilizados, mantendo a quantidade de parasitas obtidos. A aplicação de 200 mg/kg de ciclofosfamida dois dias após a infecção reduziu o número de animais por semana em até 76%, mantendo o pico de parasitemia e a quantidade de parasitas. Assim, este estudo comprova a possibilidade e a eficácia da aplicação de novos protocolos que visem o bem-estar animal e principalmente a redução do número de animais. Nossos resultados demonstram a redução de até 3.317 camundongos por ano e a manutenção da quantidade das formas tripomastigotas infectantes em  $25 \text{ parasitas} \times 10^6 / \text{ml}$  por semana. Certificado CEUA nº 20/08 FIOCRUZ.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*. Ciclofosfamida. Ética. Camundongos.

1 Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro

Autor para correspondência:  
Gabriel Melo de Oliveira  
E-mail: gmoliveira@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação: 30/06/2011  
Aceito para publicação: 28/11/2011

## 1 INTRODUÇÃO

O Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz (LBC/IOC) é responsável por número considerável de publicações de artigos científicos de alto impacto. Uma grande parte do laboratório utiliza o modelo experimental camundongo para o estudo de vários aspectos da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, direta ou indiretamente. Os diversos ensaios realizados *in vivo* exigem a manutenção semanal, bem como aquisição de formas infectantes (tripomastigotas sanguíneas) de *T. cruzi* de camundongos. Em 2005, o número total de animais utilizados em nosso laboratório

foi 13.120 camundongos, dos quais cerca de 4.373 animais foram direcionados para a manutenção e obtenção de formas infectantes de *T. cruzi*. Isto significa que a cada semana 90 animais foram usados para a obtenção de aproximadamente  $70 \times 10^6$  parasitas/ml. O volume final de parasitas obtidos foi utilizado na infecção de outros camundongos para ensaios *in vivo* ou em experimentos de cultura de células (*in vitro*).

O uso ético de animais em ensaios biomédicos apresenta as questões de justificativa e necessidade do uso desses animais para benefício próprio e dos seres humanos<sup>1</sup>. De acordo com Rivera<sup>2</sup>, o comportamento ético significa adotar padrões de conduta baseadas em escolhas morais feitas à luz

de critérios racionais. Essas escolhas devem ser feitas com consciência plena e total responsabilidade de suas possíveis consequências. Straughan<sup>3</sup> discute que questões éticas surgem em nossa vida diária. São difíceis, complexas e requerem uma cuidadosa análise e reflexão. Em 1959, “The Principles of Humane Experimental Technique” foi apresentado por William Russell e Burch Rex. Essa obra foi o resultado de um estudo sistemático de desenvolvimento ético e humanitário das técnicas em experimentos com animais. Resumindo, o princípio dos três Rs são determinados pela substituição, refinamento e redução no uso de animais de laboratório<sup>4</sup>.

Através dos resultados de trabalhos anteriores, observamos que o uso de imunossuppressores, como a ciclofosfamida, na infecção pelo *T. cruzi*<sup>5</sup> promove um significativo aumento no número de parasitas<sup>6,7</sup>. Porém, existem vários efeitos sobre o sistema imune de camundongos, dependendo da dose e do tempo de administração<sup>8</sup>. Este estudo tem como objetivo estabelecer um protocolo de redução do número de camundongos utilizados para a obtenção de formas infectantes de *T. cruzi*, mantendo a quantidade de formas tripomastigotas obtidas rotineiramente. Assim, elaboramos um protocolo baseado na técnica de imunossupressão por ciclofosfamida em camundongos utilizados na manutenção e aquisição da forma infectante do *T. cruzi*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho utilizamos camundongos da linhagem Swiss Webster (n=30/ensaio), machos adultos, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ). Os animais foram mantidos em nosso laboratório conforme os padrões internacionais para as condições ambientais e sanitárias<sup>9</sup>. Os procedimentos foram avaliados e autorizados sob a licença da Comissão de Ética para o Uso de Animais de Laboratório / FIOCRUZ número 20/08. Esses animais foram infectados pelo *T. cruzi* (cepa Y) com o inóculo

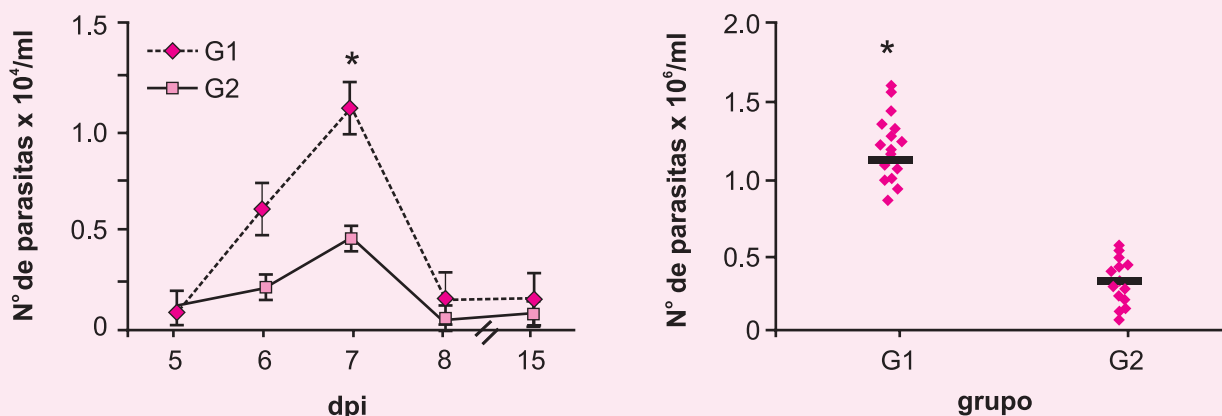
de  $1 \times 10^5$  parasitas/0.2 ml por via intraperitoneal (IP). Esse modelo (Swiss Webster & cepa Y) foi estudado por ser o protocolo estabelecido para a obtenção e manutenção do parasita em nosso laboratório<sup>10</sup>. Para obtenção de formas infectantes de *T. cruzi*, um grupo de camundongos foi eutanasiado em câmara com ambiente saturado de CO<sub>2</sub> e, após a confirmação do óbito, foi realizada a punção cardíaca para purificação do inóculo. O grupo submetido à imunossupressão foi inoculado com a dose infectante de  $1 \times 10^5$  parasitas/0.2 ml IP e a imunossupressão foi induzida no segundo dia pós-infecção (2º dpi) pela administração de ciclofosfamida (CY - Genuxal® 200 mg - Asta Medica) na dosagem de 200 mg/kg de peso corporal por via IP. A cinética de parasitemia foi utilizada para quantificar o número individual de parasitas circulantes por meio do método descrito por Pizzi & Brenner entre o 9º e o 15º dpi<sup>10</sup>. A obtenção de macrófagos peritoneais, realizada após a eutanásia dos animais em câmara com ambiente saturado de CO<sub>2</sub>, foi coletada através de lavagem da cavidade peritoneal com meio de cultura DMES. Após 2 horas (h) as culturas foram lavadas e infectadas com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* numa relação 10 células:1 célula. Após 24 h de interação, as culturas também foram lavadas para retirar os parasitas no sobrenadante. As culturas foram fixadas em solução de Bouin por 5 minutos, coradas com Giemsa e o nível de infecção foi quantificado através do número de parasitas por 100 células. Utilizamos os testes estatísticos: *T Student* e *Mann-Whitney* (não paramétrico) para determinar a significância ( $p \leq 0,01$ ) entre o número médio de parasitas obtidos após imunossupressão por camundongo em comparação com animais não imunossuprimidos e a capacidade infectiva de parasitas em macrófagos.

## 3 RESULTADOS

Inicialmente comparamos a cinética de parasitemia para os camundongos que receberam tratamento de CY dois dias após a infecção (G1) e o grupo

de animais que não receberam nenhum tratamento (G2) (Figura 1). Observamos que o tratamento não alterou o modelo de infecção; ambos os grupos demonstraram o pico de parasitemia no 7º dpi (Figura 1A). No entanto, nesse mesmo dia, a quantificação de parasitemia do G1 foi de aproximadamente  $1,2 \times 10^4$  parasitas/ml, enquanto que o G2 teve um nível de  $0,45 \times 10^4$  parasitas/ml (Figura 1B). Estimamos o número de camundongos *versus* número de parasitas. Aproximadamente 90 animais/semana foram usados para obter  $70 \times 10^6$  parasitas/ml por semana, então, cada animal apresenta um rendimento médio de  $0,28 \times 10^6$  parasitas/ml. O tratamento com CY promoveu um aumento significativo ( $p = 0,004$ ) no número de parasitas obtidos de cada

camundongo para cerca de  $1,17 \times 10^6$  parasitas/ml. Assim, para obter o número necessário de parasitas ( $70 \times 10^6$  parasitas/ml), poderíamos utilizar um número de 22 camundongos por semana (Tabela 1). Em relação à infectividade dos parasitas obtidos de camundongos tratados com a CY, nenhuma alteração significativa foi observada pela invasão de macrófagos peritoneais. Na cultura de células, os macrófagos infectados mostraram números semelhantes de parasitas internalizados, infectados tanto pelos parasitas do grupo G1 quanto do G2, nos períodos de 24h (16.7 e 15.9 parasitas/mac -  $p = 0,1$ ), 48h (25.0 e 33.0 parasitas/mac -  $p = 0,1$ ) e 72h (124.3 e 10.8 parasitas/mac -  $p = 0,1$ ) de interação (Tabela 2).



**Figura 1** – Cinética de parasitemia em camundongos tratados com Cy (G1) e não tratados (G2) durante o curso da infecção pelo *T. cruzi*. **A:** Parasitemia entre os dias 5º e 15º dpi. Perfil de infecção de G1 semelhante ao G2. **B:** Número médio de parasitas sanguíneos no 7º dpi (máximo de parasitismo). G1 (\*) teve um número significativamente maior de parasitas ( $p \leq 0,01$ ) quando comparado com o G2 ( $G1 > G2, p = 0,005$ )

**Tabela 1** - Relação entre o número de parasitas e de camundongos

Categoria / ano	2005	2009
Nº camundongo / semana	90	22
Nº de parasitas / camundongo	0.2 parasitas x 10 <sup>6</sup> / ml	1.17 parasitas x 10 <sup>6</sup> / ml
Nº de parasitas / semana	25 parasitas x 10 <sup>6</sup> / ml	25 parasitas x 10 <sup>6</sup> / ml
Nº total de camundongos / ano	4.373	1.056

**Tabela 2 - Número de parasitas em macrófagos peritoneais**

Categoria / ano	24h	48h	72h
<b>G1</b>	16.7 ± 0.8	25.0 ± 1.2	124.3 ± 5.8
<b>G2</b>	15.9 ± 1.7	33.0 ± 3.4	108.1 ± 11.9

#### 4 DISCUSSÃO

Durante anos, a rotina para a coleta de tripomastigotas sanguíneos obtidos em nosso laboratório foi realizada, utilizando o modelo experimental de camundongos Swiss Webster & *T. cruzi* (cepa Y). Definindo o inóculo em  $1 \times 10^5$  parasitas/0.2 ml em cada animal (IP), observamos o pico de parasitemia no 7º dpi. A manutenção desta cepa de parasita exige um novo grupo de camundongos para infecção a cada semana. Em 2005, a única opção para aumentar o número de parasitas era o aumento do número de animais infectados. Calabrese et al.<sup>6</sup> descreveram que o uso de CY modula a intensidade da miocardite e da carga parasitária e está diretamente relacionada à dosagem e aos dias de imunossupressão. Camundongos tratados com uma única dose de CY (200 mg/kg), dois dias antes da infecção, apresentaram um pico de parasitemia semelhante entre os grupos tratados e os não tratados. Entretanto, os camundongos submetidos à imunossupressão com a mesma dose no 5º dpi mostrou um aumento constante na parasitemia em comparação aos animais que não foram imunossuprimidos<sup>5</sup>. Nossos resultados demonstraram que o protocolo mais eficiente ocorre quando o tratamento é realizado com CY no 2º dpi com uma dose de 200 mg/kg. O aumento mais significativo no número de parasitas ocorreu durante o pico de parasitemia no 7º dpi. Esses resultados representam uma possibilidade de redução de até 76% no número de animais utilizados por ano. A contagem dos parasitas internalizados nos macrófagos peritoneais em ambos os grupos não mostraram diferença significativa. Assim, podemos concluir que a ação

da CY está diretamente relacionada com as células do sistema imunológico dos camundongos e não interfere com a infectividade do parasita<sup>6</sup>. Então, para obtermos a quantidade média de parasitas usados em nosso laboratório ( $70 \times 10^6$  parasitas/ml) por semana podemos usar aproximadamente 70% menos animais do que o atualmente utilizado. Desta forma, alcançamos a meta de estabelecer um novo protocolo técnico para a obtenção de formas infectantes do *T. cruzi* com uma redução significativa no número de camundongos utilizados. Por meio desse protocolo, mesmo com o aumento do volume de ensaios e a necessidade de aumentar o número de parasitas, cerca de 3.000 animais serão previstos para uso em 2010. Ressaltamos ainda que nosso objetivo é reduzir ainda mais o número de animais utilizados na manutenção e aquisição de formas infectantes de *T. cruzi* em camundongos, usando uma passagem semanal em cultura de células. Isso nos leva a crer que, num futuro próximo, veremos o princípio ético de reduzir não só o número de camundongos utilizados, mas também a substituição de animais em nosso laboratório.

#### 5 CONCLUSÃO

Este estudo comprova a possibilidade e a eficácia da aplicação de novos protocolos que visem ao bem-estar animal e principalmente à redução do número de animais. Nossos resultados demonstram a redução de até 3.317 camundongos por ano e a manutenção da quantidade das formas tripomastigotas infectantes em  $25 \text{ parasitas} \times 10^6$  ml por semana.

# REDUCING THE NUMBER OF MICE USED TO OBTAIN INFECTIVE FORMS OF *TRYPANOSOMA CRUZI* BY IMMUNOSUPPRESSION WITH CYCLOPHOSPHAMIDE

## ABSTRACT

The experimental infection by *Trypanosoma cruzi* in the Laboratory of Cell Biology / IOC is performed by obtaining the infective form (trypomastigote blood) in mice. In 2005, we used about 250 animals per week to achieve the volume of  $70 \times 10^6$  parasites/ml. According to the ethical principles described to reduce the number of animals used in scientific trials, we developed a protocol of immunosuppression with cyclophosphamide. Our goal was to establish a protocol for reducing the number of mice used, keeping the number of parasites obtained. The application of 200 mg/kg of cyclophosphamide two days after infection reduced the number of animals per week up to 76%, keeping the peak of parasitemia and the number of parasites. Thus, this study demonstrated the feasibility and effectiveness of the implementation of new protocols aimed at animal welfare and especially reducing the number of animals. Our results showed a reduction of up to 3,317 mice per year and maintaining the quantity of infective trypomastigotes in  $25 \times 10^6$  parasites/ml per week. Certified CEUA nº. 20/08 FIOCRUZ.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*. Cyclophosphamide. Ethics. Mice.

## REFERÊNCIAS

- Rivera EB, Rodrigues UP. Ética na utilização de modelos animais. In: Lapchik V, Mattaraia V, Ko G, editores. Cuidados e manejos de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 37-43.
- Rivera EB. Ética e bem-estar animal. In: Rivera E. Ética e bioética aplicadas à Medicina Veterinária. Goiânia: Editora UGO; 2006. p. 101-20.
- Straughan R. Ethics, morality and animal biotechnology. The Biotechnology and biological sciences research council (BBSRC). 3rd ed. UK: BBSRC; 1999.
- Braga LM. Os 3 Rs. In: Lapchik V, Mattaraia V, Ko G, editors. Cuidados e manejos de animais de laboratório. São Paulo: Ateneu; 2009. p. 29-37.
- Calabrese KS. Immunosuppressive drugs as a tool to explore immunopathology in experimental Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:273-6.
- Calabrese K, Lagrange PH, da Costa SC. Chagas' disease: enhancement of systemic inflammatory reaction in cyclophosphamide treated mice. Int J Immunopharmacol. 1996 Aug-Sep;18(8-9):505-14.
- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. Am J Pathol. 1987 Jun;127(3):467-73.
- Kumar R, Kline IK, Abelmann WH. Immunosuppression in experimental acute and subacute Chagasic myocarditis. Am J Trop Med Hyg. 1970 Nov;19(6):932-9.
- Conselho Canadense de Proteção aos Animais (CCPA). Manual sobre el cuidado y uso de los animals de experimentación. 2a ed. Canadá: Canadian Council editors; 1998.
- Araújo-Jorge TC. Modelos animais para o estudo in vivo da doença de Chagas – Camundongo. In: Araújo-Jorge TC, de Castro SL, editores. Doença de Chagas: manual para experimentação animal. 1a ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000. p. 134-40.