

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

TESE DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DE CRIPTOSPORIDIOSE EM CAMUNDONGOS  
E EXPANSÃO *IN VITRO* DE LINFÓCITOS T ESPECÍFICOS PARA  
ANTÍGENOS DE *Cryptosporidium parvum*

*Márcia Cristina Aquino Teixeira*

Salvador - Bahia

1996

593.192:616-097

T266a

Ex.1



002086



**MÁRCIA CRISTINA AQUINO TEIXEIRA**

**AVALIAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DE CRIPTOSPORIDIOSE EM  
CAMUNDONGOS E EXPANSÃO *IN VITRO* DE LINFÓCITOS T  
ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS DE *CRYPTOSPORIDIUM*  
*PARVUM***

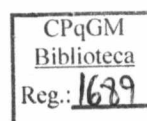
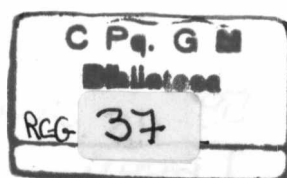
**Orientação: Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho**

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz para a obtenção do título  
de Mestre em Biologia Celular e Molecular na área de concentração em  
Imunologia**

**Instituto Oswaldo Cruz**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**1996**



CPZO

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

---

Teixeira, Márcia Cristina Aquino

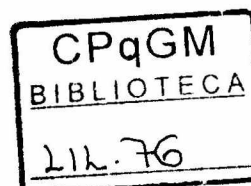
T266      Avaliação de modelo experimental de criptosporidiose em camundongos e expansão *in vitro* de linfócitos T específicos para antígenos de *Cryptosporidium parvum*./ Márcia Cristina Aquino Teixeira - Rio de Janeiro : Instituto Oswaldo Cruz, 1966. 134p.:il.

Dissertação e Tese (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, 1966.

1. *Cryptosporidium*. 2. Coccídeos. 3. Imunossupressão. 4. Linfócitos T. 5. Resposta de anticorpo. I. t.

---

CDU 593.192:616-097:612.112



Este trabalho foi desenvolvido principalmente, no Laboratório de Imunologia Molecular e Celular (LIMC) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) - FIOCRUZ, Bahia.

Alguns experimentos foram realizados no Laboratório Especial de Imunogenética do Instituto Butantan, São Paulo, e no Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade do Arizona, Arizona, USA.

A possibilidade de arriscar  
é que nos faz homens.

Vôo perfeito  
no espaço em que criamos.

Ninguém decide  
sobre os passos que evitamos.

Certeza de que não somos pássaros  
e que voamos.

Tristeza de que não vamos  
por medo dos caminhos.

**Damário da Cruz**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, idealizador deste trabalho, pelo estímulo e orientação.

Ao Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas por sua contribuição como revisor prévio desta tese.

Aos pesquisadores participantes da banca examinadora: Dr. Sérgio Gomes Coutinho, Dr. Edgar Marcelino de Carvalho e Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas pelas suas excelentes sugestões.

Ao Dr. Osvaldo A. Sant'Anna pelo auxílio no desenvolvimento de parte deste trabalho, realizado no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, São Paulo.

Ao Dr. Charles R. Sterling por me receber em seu Laboratório, e pela sua orientação nos experimentos realizados na Universidade do Arizona, USA.

A Prof. Neuza Maria Alcântara Neves, pelo incentivo na pesquisa em criptosporidiose e no meu ingresso no curso de Mestrado.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Imunologia Molecular e Celular (LIMC), Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) e pessoal da Secretaria.

A Dra. Ayda Costa, Dra. Conceição Guerra e demais colegas do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN-SESAB), pela compreensão e incentivo.

Aos familiares e amigos pelo carinho e estímulo.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1. Taxonomia.....	03
1.2. Ciclo de Vida.....	05
1.3. Cultivo.....	07
1.4. Epidemiologia.....	08
1.5. Patogenia e Quadro Clínico.....	11
1.6. Imunidade Celular e Humoral.....	13
1.7. Diagnóstico.....	17
1.8. Antígenos.....	19
1.9. Tratamento.....	20
1.10. Modelos Animais.....	23
<b>2. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA</b> .....	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1. Produção e purificação de oocistos.....	30
3.2. Grupos de animais.....	31
3.2.1. Camundongos imunossuprimidos com glucocorticóide.....	31
3.2.2. Camundongos SCID.....	32
3.2.3. Camundongos bons (H) e maus (L) produtores de anticorpos....	33
3.3. Infecção e imunização de camundongos.....	34
3.4. Determinação da eliminação de oocistos em animais infectados.....	35
3.5. Exame histológico.....	36
3.6. Determinação dos níveis de anticorpos anti- <i>Cryptosporidium</i> em camundongos infectados ou imunizados com antígeno.....	36

3.7. Análise estatística e genética.....	38
3.8. Preparação do antígeno.....	39
3.9. Estabelecimento de linhagens de linfócitos T específicos para <i>Cryptosporidium</i> .....	40
3.9.1. Imunização dos animais.....	40
3.9.2. Preparo da suspensão celular.....	40
3.9.3. Depleção de células B.....	41
3.9.4. Preparo das células apresentadoras de antígeno.....	42
3.9.5. Ensaio linfoproliferativo.....	43
3.9.6. Obtenção de TCGF.....	44
3.9.7. Cultivo de células T imunes.....	45
3.9.8. Diluição limitante.....	45
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
4.1. Avaliação de modelo experimental para a criptosporidiose.....	47
4.1.1. Camundongos imunossuprimidos com dexametasona.....	47
4.1.2. Camundongos SCID.....	54
4.1.3. Camundongos bons (H) e maus (L) produtores de anticorpos....	56
4.1.4. Estudo da resposta imune humoral anti- <i>Cryptosporidium</i> em linhagens H e L, e em camundongos BALB/c e C57BL/6.....	59
4.2. Estabelecimento de linhagens de linfócitos T específicos para <i>Cryptosporidium</i> e clonagem.....	78
4.2.1. Resposta linfoproliferativa a antígenos de <i>Cryptosporidium</i> .....	78
4.2.2. Obtenção de clones de células T respondedoras a antígenos de <i>Cryptosporidium</i> .....	83



<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	85
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	107
<b>7. RESUMO</b> .....	109
<b>8. SUMMARY</b> .....	111
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	113
<b>10. ANEXO</b> .....	135

## 1. INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* causam diarreia em animais, inclusive no homem, tendo maior prevalência em hospedeiros jovens ou portadores de algum tipo de imunodeficiência (Tzipori, 1983). Estes pequenos coccídeos (2-6  $\mu\text{m}$  de diâmetro) invadem e se replicam dentro de células epiteliais dos tratos digestivo e respiratório de vertebrados (Angus, 1983; Tzipori, 1983; Fayer e Ungar, 1986). Identificados por Tyzzer em 1907, permaneceram como simples curiosidade biomédica até a década de 70, quando ainda se acreditava ser o *Cryptosporidium* raro em animais e um patógeno oportunista para indivíduos com imunodeficiências. O interesse da medicina veterinária no protozoário surgiu após o primeiro relato de associação entre o parasito e diarreia bovina (Pancieri e cols., 1971). Além de ser reconhecido como importante agente causador de diarreia em bezerros e ovelhas, algumas espécies de *Cryptosporidium* causam doença respiratória em aves. Os primeiros casos de criptosporidiose humana foram relatados em 1976 (Miesel e cols., 1976; Nime e cols., 1976). Relatos posteriores demonstraram que o *Cryptosporidium* sp ou *C. parvum* pode causar diarreia autolimitada em indivíduos imunocompetentes e diarreia grave, semelhante à cólera, em indivíduos imunodeprimidos, especialmente aqueles com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Tzipori, 1983; Current e cols., 1983; Fayer e Ungar, 1986). Nenhuma terapia eficaz foi desenvolvida até o presente momento, assim o encontro deste parasito em pacientes com AIDS indica um mau prognóstico. Relatos de criptosporidiose respiratória e biliar demonstram que o protozoário não está restrito ao trato gastrointestinal e sugerem que o

parasito é pouco reconhecido como causa de doenças respiratórias e biliares, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos.

Uma revisão de 36 estudos em larga escala de populações selecionadas (Fayer e Ungar, 1986), tais como crianças ou adultos com sintomas gastrointestinais, indica que o *Cryptosporidium parvum* é um parasito cosmopolita, estando associado a diarreia em seres humanos em todas as regiões pesquisadas, com maior prevalência em residentes de países em desenvolvimento. Por exemplo, as prevalências relatadas em estudos na Europa (1-2%) e América do Norte (0,6-4,3%) são menores que aquelas relatadas em países como Ásia, Austrália, África, América Central e América do Sul (3-20%). Estes estudos, juntamente com outros demonstrando que o parasito pode ser um agente etiológico de diarreia em crianças que frequentam creches (Combee e cols., 1986; Heijbel e cols., 1987) e responsável por surtos de diarreia provenientes de água contaminada (D'Antonio e cols., 1985; MacKensie e cols., 1994), resultaram no reconhecimento do *C. parvum* como enteropatógeno humano cosmopolita de grande importância. Um surto epidêmico ocorrido na cidade de Milwaukee, nos Estados Unidos, chegou a atingir 403.000 pessoas (MacKensie e cols., 1994). Embora ocorram esporadicamente surtos epidêmicos em países desenvolvidos, a notoriedade alcançada pelo parasito deve-se principalmente, à sua associação com infecções em pacientes com AIDS e em crianças desnutridas de países subdesenvolvidos.

Apesar do número crescente de trabalhos publicados e de laboratórios dedicando-se ao estudo da criptosporidiose, o conhecimento sobre a resposta imunológica ao parasito ainda é muito limitado, principalmente nos países do

terceiro mundo como no Brasil, onde a escassez de estudos é determinada, entre outros fatores, pela dificuldade de obtenção de oocistos puros para produção de antígeno. Pesquisas sobre doenças diarreicas e outros sintomas gastrointestinais sugerem que *Cryptosporidium* sp é um dos três enteropatógenos causadores de diarreia mais importantes no mundo (Navin e Juranek, 1984; Crawford e Vermund, 1988). Entretanto, estudos em larga escala em diferentes regiões geográficas devem continuar sendo realizados para esclarecer o papel da criptosporidiose como causa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes. Alguns aspectos no estudo da criptosporidiose devem ser enfatizados no futuro para um melhor entendimento da doença, tais como: 1. relação entre idade do hospedeiro e a susceptibilidade à infecção; 2. identificação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da imunidade adquirida; 3. desenvolvimento de um modelo animal que mais se assemelhe à infecção humana; 4. desenvolvimento de métodos de cultivo *in vitro* que permitam a produção de estádios do parasito em larga escala; 5. identificação e isolamento de antígenos dos diversos estádios do ciclo de vida do parasito para avaliação da resposta imune contra as diferentes fases evolutivas e, principalmente, 6. o desenvolvimento de tratamento efetivo.

### 1.1. TAXONOMIA

O *Cryptosporidium* foi primeiramente descrito por Tyzzer em glândulas gástricas de camundongos (Tyzzer, 1907). Coccídeos deste gênero são classificados no filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse

Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Cryptosporidiidae (Levine, 1984). A maioria das espécies de *Cryptosporidium* denominadas na literatura após a identificação do gênero por Tyzzer, foram propostas na premissa de que os coccídeos eram hospedeiro-específicos. Entretanto, estudos de transmissão cruzada demonstraram pouco ou nenhuma especificidade dos isolados de *Cryptosporidium* encontrados em mamíferos. Além disso, infecção humana experimental com oocistos de várias espécies animais enfatizou o potencial zoonótico do organismo (Fayer e Ungar, 1986; Fayer e cols., 1990a). Estes estudos sugerem a existência de seis espécies: *C. muris* e *C. parvum* infectando mamíferos, *C. meleagridis* infectando aves de granja, *C. baileyi* infectando pássaros, *C. serpentis* infectando cobras e *C. nasorum* infectando peixes (Fayer e Ungar, 1986; Fayer e cols., 1990a).

Análises do DNA de isolados de *C. parvum* e *C. baileyi* mostraram que existem diferenças inter e intraespécies (Mead e cols., 1988; Mead e cols., 1990). As diferenças moleculares entre isolados de *C. parvum* poderiam estar relacionadas com as diferenças na gravidade da infecção humana.

O *C. muris* e o *C. parvum* diferem biologicamente: o último coloniza apenas a mucosa intestinal e produz diarreia grave em mamíferos, enquanto o primeiro infecta glândulas gástricas de camundongos e o abomaso de bovinos. Além disso, os oocistos e os esporozoítos de *C. muris* são consideravelmente maiores que os de *C. parvum* (Current, 1986). O *C. parvum* é a única espécie que causa infecção e doença no homem, e embora diferenças no comportamento biológico e moleculares tenham sido notadas entre isolados de *C. parvum* infectando várias espécies animais, a existência de subespécies ou cepas ainda não foi proposta.

## 1.2. CICLO DE VIDA

Estudos de diferentes isolados (humanos e bovinos) de *C. parvum* em modelos experimentais, utilizando camundongos neonatos (Current e Reese, 1986), embrião de galinha (Current e Long, 1983) ou cultura de células (Current e Haynes, 1984), revelaram que o ciclo de vida do parasito é similar a de outros coccídeos intestinais monoxenos, consistindo de uma fase assexuada e uma fase sexuada, as quais ocorrem no mesmo hospedeiro. O ciclo pode ser dividido em seis etapas: 1. desencistamento com liberação dos esporozoítos ou formas infectantes; 2. merogonia, a multiplicação assexuada dentro da célula hospedeira; 3. gametogonia, a formação dos gametas masculino (micro) e feminino (macro); 4. fecundação, a união do microgameta com o macrogameta; 5. formação da parede cística para produção do estágio resistente ou oocisto, que transmite a infecção de um hospedeiro a outro; 6. esporogonia com a formação dos esporozoítos infectantes dentro do oocisto.

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* inicia-se com a ingestão pelos animais hospedeiros de oocistos contendo esporozoítos que são denominados de "nus" por não estarem encerrados dentro de esporocistos como outros coccídeos. Os oocistos desencistam no intestino delgado do hospedeiro susceptível, liberando os esporozoítos infectantes que invadem os enterócitos. Como para outros coccídeos, a exposição a substâncias redutoras, a enzimas digestivas e a sais biliares promovem o desencistamento. A exposição artificial dos oocistos a estas condições também pode induzir o desencistamento (Current, 1990). Os esporozoítos, assim como outros estádios do ciclo de vida,

aderem às células intestinais, invadindo-as, permanecendo logo abaixo da membrana plasmática em uma estrutura denominada de vacúolo parasitóforo (Lumb e cols., 1988). Esta localização diferencia o *Cryptosporidium* de outros coccídeos típicos como por exemplo a *Eimeria* sp e a *Isospora* sp, que desenvolvem-se na área perinuclear da célula hospedeira (Current e Bick, 1989). Os esporozoítos desenvolvem-se posteriormente em trofozoítos ovóides que amadurecem e sofrem merogonia dando origem de seis a oito merozoítos. A estrutura completa é chamada de meronte de primeira geração ou tipo I (Current e Reese, 1986). Os merozoítos medem cerca de  $5,3 \times 1,0 \mu\text{m}$  e têm a forma de banana com o complexo apical em uma das extremidades. Cada merozoíto tem a habilidade de invadir células epiteliais vizinhas e dar origem aos merontes de segunda geração ou tipo II, ou não avançar no ciclo dando origem a novos merontes do tipo I. Os merontes do tipo II produzem quatro merozoítos que também invadem os enterócitos adjacentes, sofrendo a multiplicação sexuada (gametogonia) e resultando na formação dos micro e macrogametócitos. O microgametócito produz 16 microgametas que fertilizam os macrogametas. Após fertilização, o zigoto desenvolve-se em um oocisto de parede grossa ou de parede fina contendo quatro esporozoítos. Os de parede grossa possuem uma parede cística formada por três membranas, constituem 80% dos oocistos formados e podem ser observados após 72 horas e durante todo o curso da infecção. Os 20% de oocistos de parede fina são raramente encontrados nas fezes do hospedeiro infectado. Estas formas são revestidas por uma parede constituída de uma única membrana e podem desencistar espontaneamente dentro do intestino ou em sítios extraintestinais, levando à persistência de infecções ou ciclo autoinfectivo em indivíduos

imunocomprometidos (Crawford e Vermund, 1988; Fayer e Ungar, 1986; Current, 1984). Oocistos de *Eimeria* sp e *Isospora* sp diferem do *Cryptosporidium* por serem excretados nas fezes antes de esporularem, o que acontece na temperatura ambiente e na presença de oxigênio (Current e Bick, 1989).

### 1.3. CULTIVO

A reprodução do ciclo completo do *C. parvum* já foi relatada em várias culturas celulares e em embrião de galinha (Current e Long, 1983; Current e Haynes, 1984; Datry e cols., 1989; Flanigan e cols., 1991). Vários tipos celulares foram utilizados com sucesso para o desenvolvimento dos diferentes estádios de *C. parvum*, como por exemplo células de pulmão humano fetal, células de rim de porco ou de rim de galinha. Entretanto o número de oocistos produzidos na cultura celular foi menor do aquele produzido em intestino de camundongo neonato ou em células endodérmicas da membrana corioalantóica (células CAM) de embrião de galinha (Current e Haynes, 1984). Estudos mais recentes relataram o desenvolvimento do *C. parvum* em células de carcinoma de colo humano que expressam algumas características de enterócitos em cultura (Datry e cols., 1989), e em células L929 de camundongos (McDonald e cols., 1990). O *C. baileyi* desenvolve todos seus estádios em células CAM de embrião de galinha, mas não em culturas celulares (Current e Long, 1983; Current e Snyder, 1988).



#### 1.4. EPIDEMIOLOGIA

Diarréia associada à infecção por *C. parvum* em animais foi relatada pela primeira vez em bezerros (Panciera e cols., 1971). A criptosporidiose foi relatada ocorrendo naturalmente em camundongos, coelhos, cobaios, gatos, cães, esquilos, guaxinins, cavalos, porcos, carneiros, cabras, gado e diversas espécies de ruminantes não domesticados (Dubey e cols., 1990). A ubiquidade do *Cryptosporidium* sp em mamíferos sugere que qualquer um desses animais pode ser fonte de infecção para o homem. Geralmente, animais com uma a três semanas de idade desenvolvem uma infecção que vai de moderada a intensa, porém com baixa mortalidade (Current, 1984). Bezerros e cobaios que se recuperaram de uma infecção experimental são imunes a reinfecções (Heine e cols., 1984; Chrisp e cols., 1990).

O primeiro caso de criptosporidiose humana foi descrito por Nime e cols. em 1976, em uma criança imunocompetente com quadro de enterocolite aguda de curso autolimitado. Neste mesmo ano, Meisel e cols. descreveram o segundo caso, desta vez em um adulto em uso de corticóides, que desenvolveu diarréia de curso prolongado, e que resolveu espontaneamente ao se interromper a medicação. O primeiro relato de indivíduo adulto imunocompetente com criptosporidiose, apresentando diarréia grave autolimitada e vômitos, foi realizado por Tzipori e cols. em 1980. A transmissão dos parasitos isolados deste paciente para camundongos e ovelhas demonstrou que este era biologicamente indistinguível de *Cryptosporidium* isolado de outros mamíferos e sugeriu o potencial zoonótico deste parasito (Tzipori e cols., 1980; Tzipori e cols., 1982). Poucos casos humanos foram

relatados até o surgimento da AIDS (Navin e Juranek, 1984). Infecções em pacientes com AIDS resultam em alta morbidade e mortalidade (Guarda e cols., 1983; Current, 1986). Relatos de criptosporidiose em pessoas imunocompetentes incluem trabalhadores da área de saúde, viajantes de países desenvolvidos, crianças que frequentam creches e seus contatos familiares (Baxby e cols., 1983; Sterling e cols., 1986; Alpert e cols., 1986). Nestes indivíduos os sintomas variam de diarreia moderada a intensa que perdura por menos de um mês (Koch e cols., 1985; Navin e Juranek, 1984).

A transmissão mais comum de oocistos de *Cryptosporidium* ocorre de pessoa para pessoa pela via fecal-oral, o que obviamente contribui para as altas prevalências em locais com precárias condições sanitárias (Tzipori, 1983). Estudos mais recentes apontam também outras fontes potenciais de infecção, tais como alimentos, água e moscas (Crawford e Vermund, 1988; Ungar, 1990; Millard e cols., 1994). A epidemiologia da criptosporidiose é indubitavelmente influenciada pela habilidade dos oocistos de parede grossa de sobreviver no meio ambiente. Estudos da resistência destes oocistos à diferentes desinfetantes químicos mostraram que a viabilidade do *Cryptosporidium*, medida pela infectividade, pode ser afetada pela exposição por 30 minutos a 10% de formalina, 50% ou mais de amônia e 1 a 2% de hipoclorito de sódio (Angus e cols., 1982; Campbel e cols., 1982). A viabilidade é também afetada pela exposição durante 30 minutos a temperaturas acima de 65°C ou -20°C (Tzipori e cols., 1982a; Anderson, 1985). Os oocistos podem permanecer viáveis durante quatro meses ou mais em solução de 2,5% de dicromato de potássio, se forem mantidos a 4°C (Current e Haynes, 1984). De acordo com o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (Center for

Disease Control-CDC), o período de incubação varia de dois a dez dias (Crawford e Vermund, 1988). Os oocistos são excretados nas fezes por nove a doze dias após infecção, mas podem ser detectados por até oito semanas em fezes de crianças e por um período maior em fezes de indivíduos imunodeficientes (Reese e cols., 1982; Current e cols., 1983; Stehr-Green e cols., 1987).

A infecção por *Cryptosporidium* é amplamente distribuída nos países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Vários estudos de prevalência já foram realizados, sendo difícil de compará-los devido a diferenças quanto a amostragem populacional e às técnicas diagnósticas empregadas (Fayer e Ungar, 1986; Crawford e Vermund, 1988; Ungar, 1990). De qualquer forma, algumas deduções podem ser feitas a partir destes estudos: a) a prevalência em países industrializados é maior em crianças que em adultos; b) a prevalência da criptosporidiose é mais elevada em países subdesenvolvidos; c) a infecção ocorre com maior frequência em pacientes sob terapia imunossupressiva ou com algum tipo de deficiência imunológica, e em crianças desnutridas, do que na população geral; d) a infecção por *Cryptosporidium* é comum em pacientes com AIDS, podendo chegar a 40% de prevalência em países subdesenvolvidos; e) durante ou logo após o período de chuvas ocorre uma elevação da positividade no exame de fezes; f) fatores de risco que podem contribuir para a infecção pelo *Cryptosporidium* incluem deficiências na imunidade celular e/ou humoral, exposição ocupacional, condições sanitárias precárias, idade, contato direto com indivíduos infectados, viagens para países em desenvolvimento, e ingestão de água e/ou alimentos contaminados.

## 1.5. PATOGENIA E QUADRO CLÍNICO

A infecção por *Cryptosporidium* resulta da ingestão oral de oocistos contaminando água e alimentos. Após desencistamento, os esporozoítos colonizam as células epiteliais do intestino delgado mantendo uma localização intracelular, porém pericitoplasmática (Casemore e cols., 1987). Em indivíduos imunocompetentes, o jejuno e íleo são os mais intensamente colonizados, enquanto que em pessoas imunocomprometidas o parasito pode colonizar áreas que se estendem da faringe ao reto (Casemore e cols., 1985; Ma, 1987). Independentemente do estado imunológico, ocorre atrofia parcial a moderada das vilosidades intestinais, juntamente com infiltração de células mononucleares na lâmina própria (Weisburguer e cols., 1979; Navin e Juraneck, 1984). O dano às vilosidades intestinais leva a um processo de má-digestão e má-absorção que pode resultar em supercrescimento da flora intestinal, mudança na pressão osmótica através da parede do intestino e no influxo de fluido para dentro do lúmen, causando a diarreia. A diarreia secretória, similar a da cólera, encontrada em pacientes imunodeficientes, sugere uma hipersecreção mediada por enterotoxina (Garza e cols., 1986). Os mecanismos envolvidos na patogenicidade do *Cryptosporidium* ainda precisam ser sistematicamente estudados em um modelo animal susceptível para se determinar os fatores que levam a alteração da função intestinal normal.

O período sintomático varia de uma a três semanas em indivíduos imunocompetentes, embora a excreção de oocistos persista por uma a quatro semanas após o desaparecimento dos sintomas (Ungar, 1990). Estudos de prevalência de infecções assintomáticas, e do período correspondente de

eliminação de oocistos nas fezes, ainda não foram realizados. A infecção sintomática por *Cryptosporidium* em indivíduos imunocompetentes caracteriza-se por diarreia aquosa que vai de moderada a intensa, raramente contendo hemácias ou leucócitos. Outros sintomas incluem cólicas abdominais, febre baixa, náusea, vômitos, dores de cabeça, fadiga e anorexia (Crawford e Vermund, 1988; Ungar, 1990). Crianças apresentando diarreia e desidratação, principalmente em países em desenvolvimento, estão sujeitas a altos riscos de morbidade e mortalidade. Infecções em indivíduos com algum tipo de comprometimento imunológico são geralmente crônicas com persistência dos sintomas e eliminação de oocistos. Quando fatores imunossupressores (desnutrição, terapia com corticóides, infecções virais, etc.) são eliminados, ocorre cura espontânea da infecção. Em pacientes portadores de HIV, entretanto, as diarreias crônicas são graves e podem levar à morte. A infecção pode se estender até ao cólon, estômago e esôfago. As diarreias nestes pacientes podem levar a perda de seis litros de líquido por dia (Crawford e Vermund, 1988; Ungar, 1990). Colonizações extraintestinais atingem principalmente a vesícula biliar e ductos biliares resultando em colecistite e colangite em indivíduos com AIDS (Ptilik e cols., 1983; Blumberg e cols., 1984; Hinnant e cols., 1989). Sítios extraintestinais mais raros incluem ductos pancreáticos levando a pancreatite (Schneiderman e cols., 1987; Hinnant e cols., 1989) e trato respiratório causando tosse, rouquidão, espirros e dispnéia (Forgacs e cols., 1983; Kocoshis e cols., 1984).

## 1.6. IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL

Estudos sobre a resposta imune na criptosporidiose sugerem que tanto a imunidade celular quanto a humoral participam na resolução da infecção. Pacientes com hipo ou agamaglobulinemias, e pacientes com imunodeficiências de células T podem desenvolver infecções crônicas (Lasser e cols., 1979; Crawford e Vermund, 1988). Indivíduos sob terapia imunossupressiva curam-se rapidamente da infecção quando o tratamento é interrompido (Miller e cols., 1983).

Um estudo sorológico de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos com criptosporidiose revelou uma resposta significativa de IgG, a partir de seis semanas, e de IgM anti-*Cryptosporidium* em duas semanas, após o diagnóstico parasitológico da doença. A resposta de IgM desapareceu dentro de quatro meses e de IgG dentro de 12 meses em pacientes imunocompetentes (Ungar e cols., 1986). Imunoglobulinas anti-*Cryptosporidium* permaneceram detectáveis por até 10 meses em vários pacientes com AIDS (Ungar e cols., 1986). Níveis elevados de IgE e IgA no soro também foram detectados em resposta a infecção pelo parasito (Casemore, 1987). A caracterização de anticorpos anti-*Cryptosporidium* da classe IgA no soro de pacientes infectados com HIV, com ou sem sintomas da criptosporidiose, mostrou níveis mais elevados do que aqueles encontrados em indivíduos imunocompetentes, sugerindo que a presença de anticorpos IgA séricos não está associada a proteção contra o *C. parvum* em pacientes com AIDS (Kassa e cols., 1991).

Como comentado acima, embora anticorpos anti-*Cryptosporidium* possam ser detectados no soro (Campbell e Current, 1983; Casemore, 1987; Ungar e cols., 1986; Kassa e cols., 1991), o papel protetor destes anticorpos é questionável. Devido a localização do *Cryptosporidium* na superfície da mucosa e ao fato de que vários estudos falharam em demonstrar papel protetor de anticorpos séricos contra outros coccídeos (Rose, 1982), é mais provável que anticorpos secretórios juntamente com mecanismos de imunidade celular, sejam os responsáveis pela resolução da doença e pela resistência do hospedeiro imunocompetente às reinfecções.

A transferência passiva de imunoglobulina através do colostro parece ser importante na proteção de lactentes contra a criptosporidiose (Mata, 1986; Guderian e cols., 1986). Como o colostro humano contém principalmente IgA secretória, a proteção é provavelmente conferida por este isotipo. Além disso, tanto anticorpos IgM quanto IgG anti- *Cryptosporidium*, foram detectados no leite materno de uma mulher que tinha se recuperado da infecção pelo protozoário (Hojlyng e cols., 1988). A administração oral de colostro bovino hiperimune produziu uma melhora da diarreia e diminuição do número de oocistos eliminados nas fezes de pacientes com AIDS e criptosporidiose (Nord e cols., 1990). Perryman e cols. (1990) demonstraram que o colostro bovino imune neutraliza esporozoítos e protege camundongos neonatos contra a infecção, corroborando com os resultados obtidos em humanos.

Análises através de "imunoblot" revelaram que o colostro bovino hiperimune reconhece mais de 40 antígenos de *C. parvum* separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença do detergente dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras (Tilley e cols., 1990).

Embora estes relatos indiquem um papel importante de imunidade humoral na resolução da infecção, outros estudos mostraram que colostro de camundongos que tinham sido previamente infectados com *Cryptosporidium* falharam em proteger camundongos neonatos contra a infecção (Arrowood e cols., 1989; Moon e cols., 1988). Além disso, camundongos tratados durante o período neonatal com anticorpos anti-IgM (anti- $\mu$ ), e posteriormente desafiados com oocistos de *Cryptosporidium*, não mostraram diferenças na frequência, intensidade ou duração da infecção quando comparados com os respectivos controles, apesar da ausência de imunoglobulinas IgM, IgG, IgA e IgE nos camundongos tratados (Taghi-Kilani e cols., 1990). Esses resultados sugerem que a resposta de anticorpo ao *Cryptosporidium* pode não ser significativa na resolução da infecção.

A maioria dos experimentos sobre a resposta imune humoral na criptosporidiose baseiam-se na determinação de anticorpos séricos. Trabalhos de investigação dos níveis de IgA em secreções intestinais, ou do número de células produtoras de IgA no intestino, durante a infecção por *Cryptosporidium*, ainda não foram descritos. Um maior número de estudos deve ser realizado para definir o papel da amamentação na prevenção e tratamento da criptosporidiose, bem como para isolar e caracterizar os possíveis componentes do leite e colostro hiperimune responsáveis pela proteção.

Estudos de microscopia eletrônica revelaram o *Cryptosporidium* dentro do citoplasma de células M no intestino delgado de cobaias (Marcial e Madara, 1986). As células M são células especializadas, presentes no epitélio que recobre os folículos linfóides do trato gastrointestinal (placas de Peyer), e que funcionam capturando e transportando antígenos do lúmen para apresentação



a linfócitos localizados logo abaixo (Roitt e cols., 1993). As formas observadas pertenciam às fases merozoíto e trofozoíto do ciclo evolutivo e as modificações estruturais de membrana observadas em enterócitos parasitados não foram encontradas nestas células. Além disso, parasitos intactos e parcialmente digeridos foram observados em macrófagos subjacentes às células M. A endocitose e o transporte de parasitos da luz intestinal até as células fagocitárias na placas de Peyer por células M, pode representar um componente essencial da imunidade a nível de mucosa. Estas observações podem ser reflexo de um mecanismo que favoreceria a autolimitação da criptosporidiose em indivíduos imunocompetentes.

Outros tipos celulares podem estar envolvidos na resistência à infecção. O papel de mastócitos foi investigado por Harp e Moon, (1991). A infecção experimental de camundongos com deficiência de mastócitos ( $W/W^m$ ) com uma semana de idade produziu resultados similares aos grupos controles (camundongos fenotipicamente normais), sugerindo que a resistência e a cura da criptosporidiose não são afetadas pelo genótipo  $W/W^m$ . Entretanto, a infecção experimental em camundongos com quatro semanas de idade, mostrou colonização do íleo mais intensa nos animais  $W/W^m$ , indicando que os mastócitos podem ser importantes na resistência inicial ao *C. parvum* nos camundongos adultos (Harp e Moon, 1991).

A importância das células T na infecção por *Cryptosporidium* está baseada na observação de que indivíduos com imunodeficiências destas células experimentam infecções mais graves e prolongadas (Crawford e Vermund, 1988). Observações similares têm sido feitas em animais onde a função de células T foi suprimida experimentalmente (Brasseur e cols. 1988;

Regh e cols., 1988). Heine e cols. (1984a) relataram que camundongos BALB/c atímicos são incapazes de curar de infecções adquiridas no período neonatal. Ungar e cols. (1990a) demonstraram que é possível estabelecer-se infecções crônicas em camundongos adultos atímicos ou camundongos depletados de células T (tratados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8). Além disto, estes pesquisadores demonstraram que a transferência de células linfóides histocompatíveis de camundongos que tinham se recuperado espontaneamente da infecção, produzia a resolução da doença nos camundongos atímicos infectados. Novos estudos nesta área demonstraram que células T CD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) são ambos necessários para prevenir o início de uma infecção, sendo que a neutralização do IFN- $\gamma$  influencia na gravidade da doença e a depleção de células CD4<sup>+</sup> afeta a sua duração (Ungar e cols., 1991). Os ensaios de investigação da resposta de linfócitos T a antígenos de *Cryptosporidium* são ainda limitados e restringem-se, até o momento, a experimentos utilizando animais.

## 1.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de criptosporidiose humana, realizado até 1978 pelo exame de material proveniente de biópsias de mucosa intestinal corados pela hematoxilina-eosina, foi substituído por métodos simples e sensíveis de identificação de oocistos em esfregaços fecais corados. As técnicas de coloração utilizadas incluem Giemsa, auramina-rodamina, fucsina carbólica-DMSO e método de Kinyoun (Henrickson e Pohlenz, 1981; Garcia e cols., 1983; Ma e Soave, 1983; Pohjola e cols., 1985; Ma, 1986). Métodos de

concentração são recomendados para aumentar a sensibilidade das técnicas, tais como flutuação em soluções saturadas de sacarose (solução de Sheather), sulfato de zinco ou cloreto de sódio. Técnicas de concentração por sedimentação incluem as de formol-éter e formol-acetato de etila (Crawford e Vermund, 1988; Soave e Johnson, 1988).

Um teste de imunofluorescência indireta para detecção de oocistos em fezes, utilizando um anticorpo monoclonal específico para antígeno de parede de oocisto foi descrito em 1986 por Sterling e Arrowood. Métodos utilizando imunofluorescência mostraram aumento significativo nas sensibilidades e especificidades quando comparados com os métodos de coloração convencionais (Garcia e cols., 1987; Crawford e Vermund, 1988; Arrowood e Sterling, 1989). Ensaio imunoenzimático utilizando anticorpos monoclonais para detecção de oocistos em fezes foram relatados, porém produziram resultados falso-positivos (Chapman e cols., 1990).

Uma vez que o número e período de excreção de oocistos nas fezes é bastante variável, métodos sorológicos para diagnóstico da criptosporidiose, principalmente em estudos epidemiológicos, devem ser utilizados. Anticorpos específicos para *Cryptosporidium* foram detectados por um ensaio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em soros de pessoas que se recuperaram de infecções confirmadas pelo exame de fezes (Campbell e Current, 1983; Casemore, 1987). Baseados no encontro de oocistos nas fezes, a sensibilidade e a especificidade do ensaio de RIFI foram de 92,6% e 85,8%, respectivamente (Campbell e Current, 1983). Métodos para detecção de anticorpos IgA, IgG e IgM anti-*Cryptosporidium* através de ELISA também foram descritos. A sensibilidade e a especificidade deste ensaio foram superiores às

de RIFI, com valores de aproximadamente 95% (Ungar e cols., 1986; Laxer e cols., 1990). Embora diversos autores tenham demonstrado forte correlação entre infecção e títulos de ELISA, existem restrições quanto à especificidade deste ensaio (Crawford e Vermund, 1988).

## 1.8. ANTÍGENOS

O desenvolvimento de técnicas de purificação de oocistos de *Cryptosporidium*, de desencistamento e de purificação de esporozoítos e paredes de oocistos, permitiu a identificação de diferentes antígenos do parasito. Além disso, estas técnicas possibilitaram a determinação dos antígenos reconhecidos pelo soro de diferentes hospedeiros que haviam se recuperado da criptosporidiose e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra vários destes antígenos. Vários estudos demonstraram que poucos antígenos da parede de oocistos e de esporozoítos são reconhecidos por soros humanos após recuperação da criptosporidiose intestinal (Ungar e Nash, 1986; Mead e cols., 1988a). Em um destes estudos foi relatado que 37 de 40 pacientes com criptosporidiose (24 com AIDS e 16 sem imunodeficiências) reconheceram, através de "imunoblot", uma proteína de esporozoíto de 23 kD separada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e sob condições redutoras (5% de mercaptoetanol). Os pesquisadores também demonstraram que 58 de 63 soros IgM- ou IgG-positivos, determinados por ELISA, reconheceram o mesmo antígeno. Em alguns soros, três bandas adicionais, entre 125 e 174 kD, foram também reconhecidas (Ungar e Nash, 1986). Mead e cols. (1988a)

relataram que soro obtido de pessoas em tempos diferentes (10 dias a um ano) após a infecção por *Cryptosporidium*, reagem fortemente com um antígeno de 20 kD separado por SDS-PAGE utilizando um gradiente de 10 a 20% ou 10% de acrilamida, sob condições redutoras. Eles concluíram que este antígeno era provavelmente o mesmo de 23 kD relatado por Ungar e cols. (1986) e que a diferença de peso molecular era devida a diferenças metodológicas. Alguns antígenos de alto peso molecular (96 a 200 kD) também foram demonstrados (Mead e cols., 1988a). As similaridades observadas entre “imunoblots” de soros imunes obtidos de pessoas, gado e cavalos sugerem que vários antígenos de esporozoíto, principalmente o antígeno de superfície de 23 kD, são conservados entre os isolados infectando estes hospedeiros (Mead e cols., 1988a), sendo candidatos para utilização em diagnóstico da doença ou na determinação de exposição prévia ao coccídeo.

## 1.9. TRATAMENTO

Embora a criptosporidiose se apresente geralmente como uma doença autolimitada, o desenvolvimento de uma terapia eficaz seria bastante útil no tratamento de diarreias graves que ocorrem ocasionalmente em crianças e adultos imunocompetentes, e principalmente, para o tratamento de pacientes com AIDS que apresentam diarreias crônicas graves que podem levar à morte. Além disso, o tratamento de animais com criptosporidiose seria de grande benefício na pecuária, onde as perdas econômicas podem ser bastante significativas devido à diarreia em animais jovens, principalmente bezerros.

Até agora, cerca de 90 métodos terapêuticos e preventivos já foram testados em estudos com animais, sem qualquer efeito (Fayer e Ungar, 1986; Crawford e Vermund, 1988). Duas drogas, espiramicina e somatostatina, mostraram certa eficácia no tratamento da criptosporidiose crônica em pacientes com AIDS (Portnoy e cols., 1984; Cook e cols., 1988). Respostas favoráveis após o tratamento com espiramicina incluem a redução do número de evacuações e do volume diarréico, com o desaparecimento de oocistos nas fezes em alguns casos (Portnoy e cols., 1984). No entanto, detalhes quanto a infecções concomitantes e dados clínicos específicos não foram analisados. O uso da espiramicina parece controlar a diarreia em indivíduos portadores de HIV com criptosporidiose apenas nos estádios iniciais da AIDS (Soave e Armstrong, 1985). A administração continuada de octreotídeo, um análogo da somatostatina, produziu melhora em um paciente com hemofilia portador de HIV (Katz e cols., 1988). Estudos cegos, entretanto, atribuíram pouca ou nenhuma eficácia a estas drogas (Wittenberg e cols., 1989). A paramomicina foi utilizada com sucesso no tratamento da criptosporidiose. Entretanto, o pequeno número de pacientes no estudo não permitiu a determinação da eficácia da droga (Armitage e cols., 1992).

Na ausência de um tratamento eficaz para a criptosporidiose, a intervenção clínica baseia-se na terapia de suporte para pessoas imunodeficientes e imunocompetentes, principalmente crianças subnutridas. A nutrição parenteral é recomendada em casos de diarreia persistente (Current e cols., 1983; Modigliani e cols., 1985).

Uma vez que não existe uma quimioterapia eficaz para o controle da criptosporidiose e que o estado imunológico do hospedeiro parece ser o

principal fator que determina a gravidade e a duração da doença (Current e Bick, 1989), procurou-se restaurar a imunocompetência do indivíduo através de intervenção imunológica. Indivíduos sob terapia imunossupressiva mostraram remissão dos sintomas quando a terapia foi descontinuada (Crawford e Vermund, 1988; Ungar, 1990). A administração de extrato dialisado de leucócitos bovinos, preparado de células de linfonodo de animais imunizados com *C. parvum*, em pacientes com AIDS, levou a um aumento de peso e melhora da diarreia em seis de sete indivíduos, sendo que cinco pararam de excretar oocistos nas fezes com a continuidade do tratamento (McMeeking e cols., 1990). Embora estudos *in vitro* utilizando antígenos de *C. parvum* não tenham sido realizados para esclarecer o mecanismo de ação do extrato dialisado de leucócitos imune, postulou-se que este é capaz de levar à melhora clínica e parasitológica através do aumento da resposta imune celular, como previamente demonstrado para outros coccídeos (Klesius e Kristensen, 1977; Klesius e cols., 1978).

Apesar dos resultados controversos em relação ao papel da resposta humoral na proteção contra a criptosporidiose (ver seção anterior), alguns estudos indicam que o colostro obtido de vacas hiperimunizadas com antígenos totais de oocistos e esporozoítos protege homens e animais contra a criptosporidiose (Tzipori e cols., 1986; Fayer e cols., 1989). Um estudo recente foi realizado com o objetivo de determinar se bile de rato imune ao *C. parvum*, contendo altos níveis de anticorpo IgA anti-*Cryptosporidium*, era eficiente no controle e/ou cura da criptosporidiose murina. A análise microscópica das secções intestinais de camundongos tratados revelaram menor intensidade da atrofia das vilosidades e da hiperplasia das criptas, e

menor número de parasitos por cripta, em relação aos controles não tratados (Albert e cols., 1994).

#### 1.10. MODELOS ANIMAIS

Apesar de diversos modelos animais para a criptosporidiose já terem sido testados, nenhum deles obteve ainda aceitação total da comunidade científica. A criptosporidiose já foi estudada em primatas (Miller e cols., 1990), ovinos (Kim e cols., 1988), suínos (Argenzio e cols., 1990) e em bovinos (Harp e cols., 1990). Estes animais podem ser experimentalmente infectados quando jovens, porém apresentam uma resistência inata à infecção a partir de um mês de idade.

O modelo animal mais utilizado até agora para se estudar a infecção por *Cryptosporidium* é o do camundongo neonato (Current e Reese, 1986; Fayer e cols., 1989). Este modelo tem sido utilizado para estudar a eficácia terapêutica de drogas e anticorpos, além do efeito do ozônio como desinfetante para os oocistos (Angus e cols., 1984; Korich e cols., 1990; Perryman e cols., 1990).

Com o objetivo de identificar modelos murinos adultos de infecção, foi realizado um estudo utilizando 19 linhagens diferentes de camundongos. Os resultados mostraram que a linhagem C57BL/6J-bg<sup>j</sup> (camundongos com deficiência de células NK) foi a única que apresentou oocistos nas fezes e números significativos de parasitos nos cortes histológicos de intestino. Estes números, entretanto, são menores que aqueles observados em camundongos BALB/c neonatos (Enriquez e Sterling, 1991).



Chrip e cols. (1990) demonstraram que tanto cobaios jovens quanto adultos são susceptíveis à infecção, embora animais com seis semanas de idade apresentassem infecção por aproximadamente duas semanas após inoculação e os cobaios com 16 semanas de idade por apenas uma semana. Este modelo permite o estudo da infecção em indivíduos imunocompetentes devido às semelhanças com a criptosporidiose apresentada por esta população.

Um outro trabalho avaliando-se a resistência ao *Cryptosporidium* de acordo com a idade do animal foi realizado por Rasmussen e Healey (1992). Grupos de hamsters foram infectados com as idades de 8-12 semanas e 20-24 meses. Animais mais velhos foram bastante susceptíveis à infecção, provavelmente devido às alterações naturais do sistema imune que ocorrem com o envelhecimento, como verificado pelos pesquisadores em testes *in vitro* (diminuição da resposta de células T e B a mitógenos e diminuição da atividade de células NK). Alternativamente, as modificações na flora bacteriana e pH do trato gastrointestinal com a idade poderiam influenciar na susceptibilidade à criptosporidiose.

Um modelo murino também utilizado foi o de camundongos  $W/W^v$ , que possuem função T normais, porém possuem deficiências nas linhagens eritrocíticas e granulocíticas, incluindo os mastócitos intestinais. Os experimentos demonstraram que camundongos  $W/W^v$  adultos são mais susceptíveis à infecção primária por *C. parvum* que os camundongos normais, embora a recuperação se processe no mesmo intervalo de tempo em ambos os grupos (Harp e Moon, 1991).

A brevidade da infecção nos modelos relacionados acima não permite tempo suficiente para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na criptosporidiose, bem como uma avaliação precisa do efeito de drogas terapêuticas. Além disso, alguns modelos oferecem dificuldades no manuseio e têm custos elevados para a manutenção dos mesmos.

A falta de um sistema "*in vitro*" e de um modelo murino adulto para a criptosporidiose crônica semelhante à infecção apresentada por indivíduos HIV positivos, levou alguns pesquisadores a desenvolverem modelos animais de imunossupressão para a doença.

A infecção por *Cryptosporidium* pode ser facilmente estabelecida em camundongos neonatos atímicos (Heine e cols., 1984a) e, utilizando-se inóculos dez vezes maiores, em camundongos atímicos adultos (Ungar e cols., 1990a). Infecções similares ocorrem em camundongos BALB/c tratados no período neonatal com anticorpos anti-CD4 ou com estes anticorpos associados a anticorpos anti-CD8. Estes modelos são úteis na definição dos defeitos do sistema imune que favorecem a criptosporidiose crônica, bem como para testes terapêuticos de drogas potencialmente úteis em pacientes com AIDS . Além disso, o elevado número de oocistos eliminados nas fezes permite um melhor delineamento da infecção, ao invés da análise de cortes intestinais provenientes de uma única necrópsia (Ungar e cols., 1990a). Em outro modelo, desenvolvido por Ungar e colaboradores (1991), foram utilizados anticorpos anti-IFN- $\gamma$  em camundongos infectados por *Cryptosporidium*. O experimento demonstrou que a deleção desta citocina favorece a replicação do protozoário, levando ao aumento da eliminação de oocistos, sendo porém, um efeito de duração limitada.

A criptosporidiose experimental também pode ser observada em camundongos SCID (severe combined immune deficient) que não possuem células T e B funcionais, bem como em camundongos NIH-III *nu/nu* que apresentam deficiência de linfócitos T, de células NK e de células LAK (Mead e cols., 1991; McDonald e cols., 1992). Tanto camundongos adultos quanto neonatos podem ser infectados, contudo, somente as infecções em neonatos são rapidamente estabelecidas, com eliminação elevada de oocistos. Infecções persistentes foram aparentemente mais letais em camundongos NIH-III *nu/nu* do que em camundongos SCID (Mead e cols., 1991).

Algumas das desvantagens apresentadas pelos modelos murinos com imunodeficiências genéticas, ou induzidas pela deleção de células T ou de seus produtos, incluem a dificuldade de estabelecimento de infecção crônica em camundongos adultos, a utilização de inóculos elevados (fato que deve ser considerado uma vez que a produção e a purificação de oocistos de *C. parvum* são extremamente laboriosas, envolvendo a infecção de animais de grande porte), e os altos custos na aquisição de reagentes e na manutenção dos animais em condições estritamente assépticas.

Para estabelecer a criptosporidiose em ratos adultos foram desenvolvidos modelos experimentais com drogas imunossupressoras, tais como a ciclofosfamida e a dexametasona (Regh e cols., 1987; Regh e cols., 1988). A manutenção da infecção por *Cryptosporidium* foi dependente da administração do corticóide, entretanto, devido a toxicidade tardia da ciclofosfamida em roedores (Anton, 1987), não foi possível estudar a criptosporidiose latente em ratos (Regh e cols., 1987). Além da infecção ter se estabelecido mais rapidamente, mesmo depois de 10 semanas da interrupção

da droga, uma forma latente foi evidenciada através da reativação da excreção de oocistos nas fezes dos animais nos quais se administrou novamente dexametasona (Regh e cols., 1988). A rápida resolução da infecção após a interrupção do tratamento com dexametasona difere do achado com ratos tratados com ciclofosfamida (Regh e cols., 1988), e sugere que as células eliminadas ou inibidas por estas duas drogas não pertencem à mesma classe.

A primeira tentativa de estabelecimento de criptosporidiose em camundongos adultos através da imunossupressão com dexametasona foi realizada por Rasmussen e colaboradores (1992a). Camundongos de 5 linhagens diferentes foram tratados com a droga, utilizando-se dosagens previamente testadas em ratos (Regh e cols., 1988). Camundongos C3H/HeN, BALB/cAnN e DBA/2N, embora desenvolvessem infecção, pararam de excretar oocistos dentro de três semanas após inoculação, enquanto que camundongos CBA foram altamente sensíveis à droga, morrendo antes mesmo da inoculação. Apenas camundongos C57BL/6 continuaram eliminando oocistos nas fezes durante o período de 28 dias.

Os modelos utilizando camundongos imunossuprimidos com glucocorticóides são de baixo custo, fácil manuseio e permitem a avaliação da infecção crônica em animais adultos sem que sejam utilizados inóculos elevados, muitas vezes não disponíveis, de *C. parvum*.

## 2. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA DO PRESENTE TRABALHO

Considerando o aumento da incidência da criptosporidiose humana e o fato de que cinco milhões de pessoas morrem anualmente de infecções gastrointestinais diversas (Holmgren, 1981; Tzipori, 1988), é imperativo a realização de estudos para um melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro na criptosporidiose. O *Cryptosporidium*, recentemente descrito como patógeno humano, tem sido apontado como um dos principais agentes em doenças diarréicas, principalmente em indivíduos com AIDS, nos quais o parasito causa doença crônica que pode levar a desidratação grave e morte. Espera-se que o número de casos de criptosporidiose nestes indivíduos aumente, uma vez que vem aumentando o número de portadores de HIV (Guarda e cols., 1983). Uma vez que não existem ainda agentes quimioterapêuticos disponíveis para a cura da criptosporidiose, o prognóstico da doença em pacientes imunocomprometidos é bastante desanimador.

Estudos sobre os mecanismos envolvidos na infecção por *Cryptosporidium* em indivíduos imunodeficientes, especialmente aqueles com AIDS, têm sido dificultados pela falta de um modelo animal para a criptosporidiose que melhor se assemelhe ao quadro visto nestes pacientes. Assim, o primeiro aspecto abordado no presente trabalho envolveu o estudo da infecção experimental em camundongos adultos imunossuprimidos por drogas ou com imunodeficiência natural ou adquirida sem interferência de agentes químicos, sendo a infecção nesses animais acompanhada até a cura espontânea ou morte devido à doença. A descrição da intensidade da infecção nestes animais pode ser bastante útil no entendimento da criptosporidiose

crônica que ocorre em indivíduos imunodeficientes, onde a diarreia pode levar à morte ou ocorrer disseminação do protozoário para outros tecidos (Crawford e Vermund, 1988; Hinnant e cols., 1989). Um modelo murino pode permitir também o estudo de fatores imunes relacionados à susceptibilidade e resistência à doença, bem como da eficácia de drogas ou intervenção imunológica na prevenção e/ou cura da infecção.

Um segundo aspecto abordado neste trabalho foi a resposta humoral anti-*Cryptosporidium* em camundongos selecionados pela intensidade de resposta de anticorpo a antígenos específicos e o curso da infecção experimental nesses animais. Além disso, estudos da resposta de linfócitos T a antígenos de *Cryptosporidium in vitro* foram realizados para se estabelecer linhagens específicas de linfócitos T que possam posteriormente ser utilizadas na pesquisa de antígenos com capacidade imunoprotetora e em estudos de transferência de imunidade passiva na criptosporidiose.

Resumidamente, este trabalho tem os seguintes objetivos:

A. Avaliar a intensidade da infecção em um modelo murino para a criptosporidiose, visando posteriormente a utilização do modelo em testes sobre a possível ação protetora de clones de linfócitos T específicos para *C. parvum*.

B. Analisar a resposta de anticorpos anti-*Cryptosporidium* em camundongos bons (H) e maus (L) produtores de anticorpos, após imunização ou infecção.

C. Padronizar as condições necessárias para a obtenção de clones de células T respondedoras a antígenos de *Cryptosporidium sp.*

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE OOCISTOS

Os oocistos de *Cryptosporidium parvum* (isolado Iowa), utilizados para infecção de camundongos, foram obtidos de bezerros infectados experimentalmente. Bezerros com 2-5 dias de idade foram inoculados oralmente com  $10^8$  oocistos. As fezes foram coletadas, conservadas em solução de dicromato de potássio a 5%, e filtradas sequencialmente através de tamizes de poros com diâmetros diferentes, tendo o último tamiz poro final de 63  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os oocistos foram então purificados como descrito previamente (Arrowood e Sterling, 1987). Resumidamente, dois gradientes de sacarose foram preparados a partir de diluições da solução de Sheather (320 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , 500 g de sacarose e 90 ml de fenol) em salina tamponada com fosfato a 0,025 M (pH 7,2), contendo Tween 80 a 1%. Dez ml da solução diluída a 1:4 (densidade 1.064) foram colocados sobre 10 ml de uma solução a 1:2 (densidade 1.103) em tubos de 50 ml. Uma amostra de 5 ml de fezes foi colocada sobre a solução 1:4 e centrifugada a 1500 g por 30 minutos. Os oocistos recuperados na interface das soluções foram lavados duas vezes com salina tamponada com fosfato a 0,025 M por centrifugação a 1900 g durante 10 minutos, e posteriormente purificados através de uma solução de Percoll (Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA). Uma solução de Percoll de densidade 1.091 foi preparada misturando-se Percoll, solução de Alsever dez vezes concentrada e água destilada na proporção 9:1:9 (pH 7,4). Um ml da preparação de oocistos, obtida pelo gradiente de sacarose, foi centrifugado

sobre 9 ml da solução de Percoll a 22.000 g por 30 minutos a temperatura ambiente. Os oocistos foram coletados de um anel formado no terço inferior da solução de Percoll, lavados como descrito acima e estocados em solução de dicromato de potássio a 2,5% a 4° C.

## 3.2. GRUPOS DE ANIMAIS

### 3.2.1. Camundongos imunossuprimidos com glucocorticóide

Para tornar animais adultos susceptíveis à criptosporidiose, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com dexametasona, via oral ou intraperitoneal, durante 14 dias, antes da inoculação com oocistos, mantendo-se a administração da droga durante o período de infecção. Camundongos fêmeas com oito semanas de idade e pesando 15 a 20 gramas foram utilizados. Grupos de seis a oito animais receberam dexametazona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diluída em água por via oral, usando agulha de gavagem, em uma concentração de 0,25 µg por grama de peso corporal por dia (aproximadamente 5 µg/dia), ou por via intraperitoneal (125 µg/dia) diariamente, começando duas semanas antes da inoculação com oocistos de *Cryptosporidium*. A administração da droga foi mantida durante todo o experimento com acompanhamento da mudança de peso a cada três dias para reajuste da concentração da droga dos grupos recebendo dexametasona oralmente. Estas dosagens foram determinadas em trabalhos anteriores como sendo as dosagens capazes de renderem ratos e camundongos susceptíveis à infecção, com baixos índices de mortalidade



(Regh e cols., 1988; Rasmussen e Healey, 1992; Rasmussen e cols., 1993). Os camundongos, juntamente com um grupo controle, não imunossuprimido, foram inoculados com  $10^6$  oocistos. Fezes foram coletadas a cada dois dias e índices de excreção de oocistos determinados por imunofluorescência indireta, conforme descrito na seção 3.4.

### 3.2.2. Camundongos SCID

Camundongos com imunodeficiência combinada grave, ou camundongos SCID, são de uma raça mutante derivada de BALB/c CB-17. Esses camundongos não têm células T e B funcionais, mas têm números normais de células mielóides e eritrocíticas. Macrófagos estão presentes em quantidades normais e são funcionais *in vitro*, mas por causa da ausência de estímulo T-dependente, não são completamente funcionais *in vivo*. Camundongos SCID também desenvolvem uma extensa população de células NK (Bosma, 1989).

Grupos de seis a oito camundongos SCID, com oito semanas de idade, foram mantidos no Biotério da Faculdade de Microbiologia da Universidade do Arizona, em uma sala isolada, sob condições "germfree" em caixas microisoladoras. Qualquer manipulação dos animais era realizada em câmara de fluxo laminar. Todas as caixas, maravalha, água e comida eram autoclavadas antes do uso. Amostras fecais foram coletadas a cada dois dias para pesquisa de oocistos pela técnica de imunofluorescência indireta. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical em intervalos de 4 semanas.

### 3.2.3. Camundongos bons (H) e maus (L) produtores de anticorpos

Camundongos H e L são de linhagens obtidas por cruzamentos seletivos bidirecionais a partir de populações de camundongos geneticamente heterogêneas, tendo como caráter fenotípico selecionador a produção máxima e mínima de anticorpos em resposta a antígenos determinados (Biozzi e cols., 1979). Camundongos bons e maus produtores de anticorpos de três seleções independentes, desenvolvidos no Departamento Animal do Instituto Biológico de São Paulo pelo grupo do Dr. O. A. Sant'Anna, foram utilizados:

GP - selecionados pela intensidade da resposta imune humoral primária a antígenos variados (ovoalbumina, eritrócitos de carneiro e antígenos somático e flagelar de *Salmonella typhymurium*) em  $H_{GP}$  e  $L_{GP}$  (Mouton e cols., 1988);

$F_1GP$  - híbrido  $H_{GP} \times L_{GP}$ ;

GS - selecionados pela intensidade da resposta imune humoral secundária a antígenos variados (ovoalbumina, eritrócitos de carneiro e antígenos somático e flagelar de *S. typhymurium*) em  $H_{GS}$  e  $L_{GS}$  (Mouton e cols., 1988);

IVa - selecionados pela intensidade da resposta imune humoral a eritrócitos de carneiro, partindo-se de uma seleção pré-existente, a seleção IV, que teve por sua vez como imunógeno selecionador o antígeno somático de *S. typhymurium* (Biozzi e cols., 1979; Ibanez e cols., 1988).

Grupos de seis a oito animais, com oito a doze semanas de idade, foram inoculados com  $10^6$  oocistos. As sangrias foram realizadas pelo plexo

retro-orbital e os sacrifícios foram realizados entre 8-14 e 30 dias após inoculação. As fezes foram coletadas a cada dois dias para pesquisa de *Cryptosporidium* através da coloração de Kinyoun, como descrito abaixo.

### 3.3. INFECÇÃO E IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Os oocistos utilizados para infectar camundongos foram estocados por no máximo quatro meses. Esses oocistos foram lavados três vezes em salina tamponada com fosfato a 0,15 M, pH 7,2 (PBS), por centrifugação a 1500 g por 10 minutos, e então ressuspensos em PBS para contagem em hemocítmetro. Cerca de seis camundongos foram infectados intragastricamente, utilizando-se seringa intradérmica de 1 ml e agulha de gavagem, com inóculo de 50  $\mu$ l contendo  $10^6$  oocistos. Os animais infectados foram mantidos separados dos camundongos controle.

A viabilidade dos parasitos foi avaliada inoculando-se oito a dez camundongos BALB/c neonatos com os mesmos oocistos utilizados para a infecção de camundongos adultos. O exame do conteúdo intestinal e de secções de íleo para a presença de *C. parvum* foram realizados oito dias após inoculação.

Além da inoculação com *Cryptosporidium*, grupos de quatro a seis camundongos das seleções GS, GP, IVa, híbridos F<sub>1</sub>GP e camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, foram imunizados, por via intraperitoneal, com 40  $\mu$ g de antígeno de *Cryptosporidium*, preparado conforme descrito na seção 3.8, homogeneizado em 200  $\mu$ l de gel de hidróxido de alumínio [5 mg de Al(OH)<sub>3</sub>.ml<sup>-1</sup>].

### 3.4. DETERMINAÇÃO DA ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS EM ANIMAIS INFECTADOS

Amostras de fezes foram coletadas dos camundongos para acompanhar o curso da infecção, através da eliminação de oocistos, durante o experimento. As fezes foram ressuspensas em formol a 10% para a técnica de imunofluorescência indireta, ou em  $K_2Cr_2O_7$  a 2,5% para a técnica de Kinyoun, em um volume de aproximadamente três vezes o das fezes. As suspensões fecais foram agitadas em vortex e deixadas sedimentar espontaneamente por três minutos; 10  $\mu$ l do sobrenadante foram colocados em lâminas de vidro, deixados secar, fixados pelo calor e testados para a presença de oocistos.

A coloração de Kinyoun ou Ziehl-Neelsen modificado baseia-se na propriedade do oocisto de se corar pela carbofucsina e de ser resistente ao descoramento pelo álcool-ácido sulfúrico a 1% (Henrickson e Pohlenz, 1981). O método revela oocistos vermelhos e brilhantes contra um fundo azulado de bactérias, fungos e outros detritos fecais. A imunofluorescência indireta foi realizada aplicando-se diretamente às lâminas sobrenadante de cultura do hibridoma OW50 que produz anticorpo monoclonal específico para antígeno de parede de oocisto (Arrowood e Sterling, 1989). Após incubação a 37° C em câmara úmida durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas três vezes por imersão em PBS e uma solução 1/100 em PBS de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, EUA) foi adicionada. Depois de incubadas e lavadas como descrito acima, as lâminas foram montadas em solução de

glicerol a 50% em PBS (pH 8,0), e examinadas com aumento de 400x usando microscópio de fluorescência. Para contagem de oocistos, cerca de 20 campos microscópicos foram avaliados.

### 3.5. EXAME HISTOLÓGICO

Após sacrifício por deslocamento cervical, amostras de tecido do fígado, pulmão, vesícula biliar, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cólon e ceco foram coletadas, fixadas em formol a 10%, embebidas em parafina, e posteriormente seccionadas e coradas por hematoxilina-eosina. Como o *Cryptosporidium parvum* coloniza preferencialmente a porção terminal do íleo de camundongos (Ernest e cols., 1986), este fragmento foi retirado a três centímetros da válvula íleo-cecal. As secções coradas foram examinadas para localização de *Cryptosporidium* por microscopia óptica em um aumento de 400x.

### 3.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTI-*Cryptosporidium* EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM OOCISTOS OU IMUNIZADOS COM ANTÍGENO

Após sangria pelo plexo retro-orbital, os soros dos animais foram separados e congelados a -20° C até o momento do teste. As concentrações séricas de IgG e IgM anti-*Cryptosporidium* foram avaliadas através de ELISA. Os poços de placas com fundo em U (Immulon II, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, EUA) foram sensibilizados a 4° C por 16 horas com 100 µl de solução de antígenos de *Cryptosporidium* (preparada como descrito na seção

3.8) a  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  em tampão bicarbonato a 0,05 M (pH 9,6). As placas foram utilizadas imediatamente ou estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes do uso, a solução antigênica foi aspirada e substituída por uma solução de PBS, contendo caseína a 1%. Após uma hora de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS contendo caseína 0,5% e Tween-20 a 0,05%) e as amostras de soros, diluídas 1/100 em PBS contendo caseína a 0,5%, foram aplicadas aos poços em triplicata. Esta diluição permitiu que os resultados não ultrapassassem os limites de intervalo no qual o ELISA é quantitativo. Depois de uma hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , as placas foram lavadas e anticorpos anti-IgG ou anti-IgM de camundongo, conjugados à peroxidase (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, EUA), foram adicionados diluídos a 1/500 em PBS contendo caseína a 0,5%. As placas foram novamente incubadas e posteriormente lavadas como descrito acima, antes de ser aplicado o sistema revelador. O sistema TMB-peroxidase (Kirkegard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Cem microlitros de uma mistura 1:1 de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio a 30% foram adicionados a cada poço e a reação bloqueada rapidamente com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 2,5 N. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 450 nm utilizando-se um fotolorímetro para microplacas (Titertek Multiskan; Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Para a padronização do ensaio foram utilizados seis soros de camundongos BALB/c adultos infectados durante o período neonatal e/ou de camundongos imunizados com antígeno de *Cryptosporidium*, e cinco soros de camundongos livres de infecção, determinado pelo exame de fezes e histológico, e sem história de exposição prévia.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA E GENÉTICA

A significância estatística das diferenças na produção de anticorpos pelos grupos de camundongos foi avaliada através do teste não paramétrico de Wilcoxon (Wilcoxon's rank-sum test; Ott, 1988).

A análise genética é baseada nas medidas dos níveis de anticorpos nas várias populações experimentais de camundongos. A resposta à seleção (R) é a diferença interlinhagem na média destes níveis em gerações consecutivas. A resposta total (RT) à seleção é a separação máxima interlinhagem no limite de seleção, ou seja,  $RT = \bar{x}H - \bar{x}L$ . Em híbridos  $F_1$  (H x L) cada locus é heterozigoto. Na ausência de dominância, o efeito aditivo total (a) de todos os

loci das linhagens parentais homozigotas é:  $a = \frac{\bar{x}H - \bar{x}L}{2}$ .

A dominância de caracteres poligênicos resulta da interação de efeitos de dominância desconhecidos ao nível de cada locus heterozigoto nos camundongos híbridos  $F_1$ , portanto é denominado de dominância global, sendo calculada através da seguinte fórmula:  $d = \bar{x}F_1 - \left[ \frac{\bar{x}H + \bar{x}L}{2} \right]$ . A proporção do efeito da dominância global em relação ao efeito aditivo é medida pela razão  $d/a$ .

Os cálculos dos parâmetros imunogenéticos indicados acima são baseados em modelos teóricos simplificados. A interpretação detalhada é discutida em Falconer (1960) e Cavalli-Sforza e Bodmer (1971).

### 3.8. PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

Oocistos purificados através de solução de Percoll foram lavados três vezes com PBS estéril centrifugando-se a 1500 g por 10 minutos. Os oocistos foram então ressuspensos em aproximadamente 5 ml de PBS e quebrados, mergulhados em banho de gelo, utilizando sonicador Branson (Branson Sonic Power Co., Danbury, CT, EUA), a intervalos de 30 segundos, até serem totalmente rompidos. A concentração proteica foi medida utilizando-se o microensaio para proteínas BCA (Microtiter Plate BCA Assay; Pierce Chemicals, Rockford, IL, EUA) e as alíquotas foram congeladas a -20° C até o uso. Os antígenos obtidos desta forma foram utilizados para a imunização de animais e o ELISA. Quando destinada a estímulos *in vitro*, a preparação antigênica era centrifugada a 1500 g por 10 minutos para eliminação de partículas e o sobrenadante era dialisado por 16 horas a 4° C contra 3 litros de PBS estéril. A solução antigênica era então esterilizada através de filtração em membrana com poros de 0,22 µm (Millipore Corp., New Bedford, Mass., EUA) e o conteúdo proteico era medido novamente para avaliar as perdas durante a filtração. Geralmente, no final do processo, a quantidade de antígeno obtida era em torno de 1,5-2,0 mg quando se sonicava cerca de  $5 \times 10^8$ - $7 \times 10^8$  oocistos.



### 3.9. ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE LINFÓCITOS T ESPECÍFICOS PARA *Cryptosporidium*

#### 3.9.1. Imunização dos animais

Duas técnicas diferentes de imunização foram utilizadas na tentativa de se obter linfócitos T respondedores *in vitro* a antígenos de *Cryptosporidium*. Grupos de cinco camundongos foram injetados subcutaneamente nas patas traseiras com cerca de 40 µg de antígeno dissolvido em PBS e emulsionado em adjuvante completo de Freund, ou injetados intraperitonealmente com a mesma quantidade de antígeno dissolvido em PBS. Os grupos controle receberam PBS com adjuvante ou apenas PBS, respectivamente. Após oito a dez dias os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os linfonodos poplíteos (imunização subcutânea) ou baço (imunização intraperitoneal) foram coletados.

#### 3.9.2. Preparo da suspensão celular

Após removidos, os órgãos foram colocados em placas de Petri estéreis, contendo 2 ml de RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF; Hyclone Laboratories, Logan, UT, EUA), cortados em pedaços pequenos e homogeneizados através de movimentos circulares contra tela de metal com poro de 200 µm de diâmetro, usando um êmbolo de seringa de 3 ml. Após remoção do tecido fibroso, a placa de Petri foi lavada com meio de cultivo e a suspensão celular

colocada em tubo de centrífuga. Depois de lavadas duas vezes por centrifugação a 200 g por 10 minutos com RPMI contendo 5% de SFB, as células foram contadas e ressuspensas para  $1,5 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Para células de baço, mais uma etapa foi realizada: a lise de eritrócitos como descrita na seção 3.9.4.

### 3.9.3. Depleção de células B

Para a remoção de células B da suspensão celular foi empregada a técnica de adsorção a anticorpos anti-imunoglobulina utilizando-se placas de Petri (100 mm de diâmetro) recobertas com anticorpos anti-imunoglobulina de camundongo (anticorpos policlonais anti-IgG, -IgA e -IgM de camundongo, produzidos em cabra, purificados por cromatografia de afinidade; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA). Primeiramente, as placas foram incubadas por 16 horas a 4° C com 5 ml de solução de anticorpos anti-imunoglobulina de camundongo a  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Após este período, a solução foi aspirada e as placas foram lavadas duas vezes com PBS. Uma solução de PBS com SBF a 10% foi adicionada às placas, incubando-se por duas horas à temperatura ambiente. A solução foi então substituída pela suspensão celular na concentração de  $1,5 \times 10^6$  células por ml em 7 ml de meio de cultivo por placa, incubando-se por 45 minutos a 37° C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi removido gentilmente e as células lavadas em RPMI por 10 minutos a 200 g, contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas para  $3 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$  em RPMI com 0,5% de soro de camundongo normal.

O ensaio de imunofluorescência indireta foi utilizado para avaliar a eficácia da depleção de linfócitos B. Resumidamente, cerca de  $3-5 \times 10^5$  células em RPMI contendo 0,1% de BSA e 20 mM de  $\text{NaN}_3$  foram incubadas durante 30 minutos, a  $4^\circ \text{C}$ , com  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de anticorpo de cabra anti-imunoglobulina total de camundongo (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA). As células foram então lavadas em RPMI por centrifugação (200g a  $4^\circ \text{C}$ , durante 10 minutos), e incubadas com anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado à fluoresceína, diluído a 1/20. Depois de incubadas e lavadas como descrito acima, as células foram ressuspensas em PBS-glicerol, pH 8,4 e examinadas sob luz UV para contagem do número de linfócitos fluorescentes, e sob luz visível, para contagem dos linfócitos totais. A avaliação da depleção de linfócitos B, através deste método, demonstrou uma redução para 5% ou menos, do número de células  $\text{Ig}^+$  na suspensão celular.

#### 3.9.4. Preparo das células apresentadoras de antígeno

Como fonte das células apresentadoras de antígeno (CAAg), necessárias ao cultivo de linfócitos T específicos, foram utilizadas células esplênicas de camundongos normais. Após remoção do baço e homogeneização do tecido, a suspensão celular foi diluída em tampão para lise de eritrócitos ACK (0,15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ / 0,01 M  $\text{KHCO}_3$ / 0,01 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  em água destilada) usando aproximadamente 4 ml de tampão por baço. A suspensão foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente com agitação ocasional, sendo as células depois lavadas duas vezes em RPMI por centrifugação durante 10 minutos a 200 g. As células foram então ressuspensas na

concentração de  $5 \times 10^7$  .ml<sup>-1</sup> em PBS, sendo então adicionados 100  $\mu$ l de uma solução estoque à 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> de mitomicina C (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) por ml de solução. A mitomicina é um agente bloqueador da síntese de DNA bastante utilizado no preparo de células apresentadoras de antígeno, visando impedir a proliferação das mesmas durante ensaios blastogênicos ou em culturas de linhagens ou clones de linfócitos T. O tubo foi envolvido em papel alumínio devido à fotossensibilidade da mitomicina, e incubado por 20 minutos a 37° C. Após incubação, as células foram lavadas três vezes em RPMI contendo 5% de SBF por centrifugação a 200 g por 10 minutos e finalmente ressuspensas à concentração final de  $5 \times 10^6$  .ml<sup>-1</sup> em meio de cultivo.

### 3.9.5. Ensaio linfoproliferativo

Com os objetivos de se estabelecer a dose ótima de antígeno, e posteriormente, de checar a especificidade das células a antígenos de *Cryptosporidium*, as células de linfonodo imune foram testadas em ensaios blastogênicos na presença de CAAg, utilizando-se concentrações diferentes (2.5, 5, 10  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) do mitógeno concanavalina A (Con A; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) em culturas de 3 dias, e de antígeno (2.5, 5, 10, 20 e 40  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) em culturas de 5 dias, em um volume final de 200  $\mu$ l de RPMI contendo 0,5% de soro de camundongo normal, 1% de solução 100 vezes concentrada de aminoácidos não essenciais, 2 mM de L-glutamina (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA), 10 mM de HEPES (Whittaker MA Bioproducts, Walkersville, MD, EUA), 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol (Sigma

Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA),  $100 \text{ U.ml}^{-1}$  de penicilina,  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de estreptomicina e  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de gentamicina (RPMI suplementado), a  $37^\circ \text{ C}$  e a 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esses períodos, as células foram pulsadas com  $1 \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, EUA) por 18 horas. As células foram coletadas em filtros de vidro usando um coletor de células semi-automático, e a radioatividade medida em cpm em contador  $\beta$ . Os dados foram computados em IE (índice de estimulação), dividindo-se a média aritmética das cpm das culturas estimuladas com mitógeno ou antígeno pela média aritmética das cpm das culturas controle, isto é, que foram incubadas na ausência de mitógeno ou antígeno.

### 3.9.6. Obtenção de TCGF (fator de crescimento de linfócitos T)

Como fonte de interleucina-2 (IL-2) para cultivo das células T, foi utilizado sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongo ativadas com Con A. Sumariamente, após o preparo da suspensão celular,  $5 \times 10^6$  células esplênicas por ml, em RPMI suplementado onde o soro de camundongongo foi substituído por SBF a 10% (RPMI-SBF), foram estimuladas com  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de Con A e incubadas por 48 horas a  $37^\circ \text{ C}$  em estufa com  $\text{CO}_2$  a 5%. Depois de centrifugar a 200 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado, acrescido de 50 mM de  $\alpha$ -metil-manosídeo para inativação de quaisquer resíduos de mitógeno, e esterilizado através de filtro Millipore com poro de  $0,22 \mu\text{m}$  de diâmetro. As alíquotas foram estocadas a  $-20^\circ \text{ C}$ .

### 3.9.7. Cultivo de células T imunes

Três milhões de células de linfonodo depletadas de linfócitos B foram cultivadas na presença de  $5 \times 10^6$  CAAg e  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de antígeno de *Cryptosporidium* em um volume total de 2 ml de RPMI suplementado por poço em placa de 24 poços. A suspensão celular foi incubada por 8 dias em estufa com  $\text{CO}_2$  a 5%, a  $37^\circ \text{C}$ . Ao final da incubação, as células foram coletadas, fracionadas através de Histopaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) para eliminação de células mortas, e novamente plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^6$  por poço juntamente com  $5 \times 10^6$  CAAg e  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de antígeno em um volume de 2 ml em RPMI-SBF suplementado. As culturas foram então incubadas por 8 dias a  $37^\circ \text{C}$  e a 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 3.9.8. Diluição limitante

A técnica de diluição limitante (Mishell e Shiigi, 1980) foi utilizada para estabelecimento de linhagens e clones de linfócitos T específicos para *Cryptosporidium*. Após incubação por oito dias na presença de antígeno, CAAg em RPMI-SBF, descrita na seção anterior, os linfócitos T foram novamente purificados em Histopaque e plaqueados na concentração de 300, 30, 3 e 0,3 células por poço em RPMI-SBF, em placa de 96 poços, juntamente com  $10 \mu\text{g}$  de antígeno,  $1 \times 10^6$  CAAg e TCGF a 10%. As células foram incubadas por 14-20 dias a  $37^\circ \text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  e poços positivos para células em crescimento foram selecionados utilizando-se microscópio invertido para visualização de colônias celulares. Após três a cinco dias, essas colônias

foram ressuspensas e transferidas para dois novos poços com acréscimo de CAAg juntamente com antígeno ou apenas CAAg em meio de cultura. Células T específicas para *Cryptosporidium* foram selecionadas dos poços onde só houve crescimento na presença de antígeno.

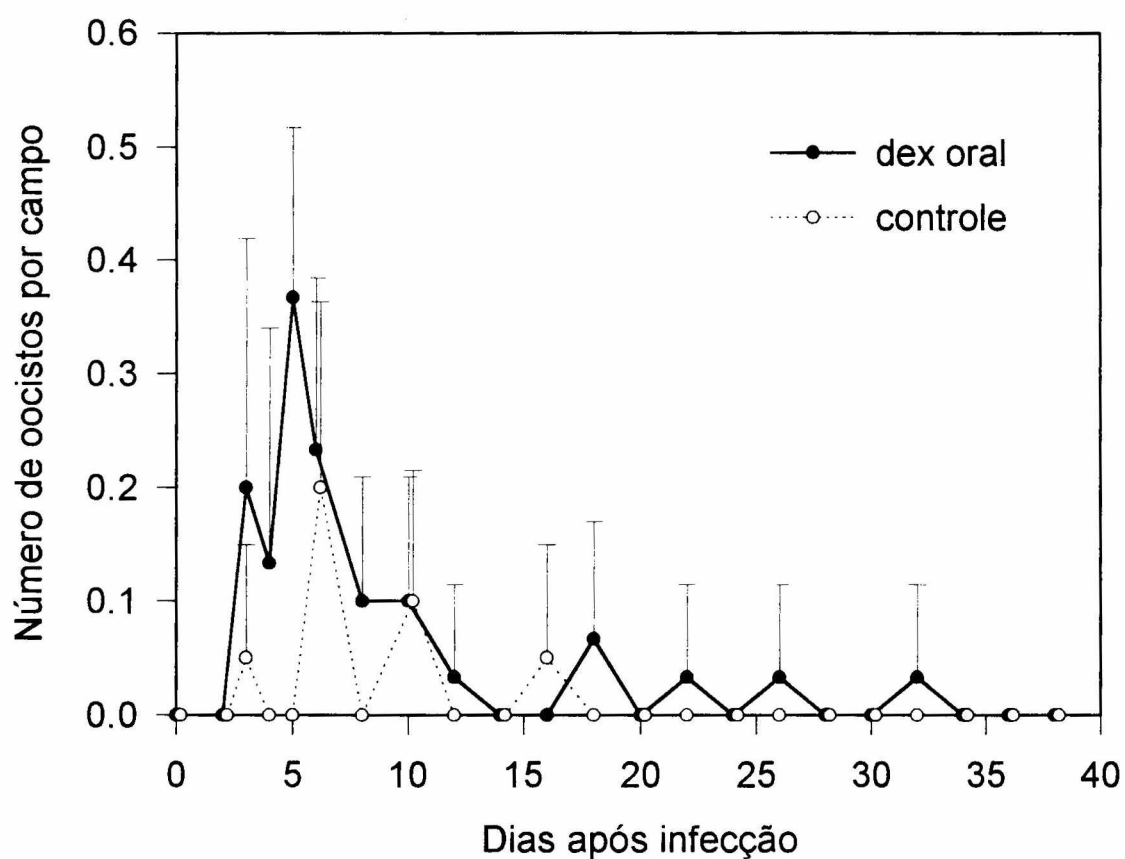
## 4. RESULTADOS

### 4.1. AVALIAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA A CRIPTOSPORIDIOSE

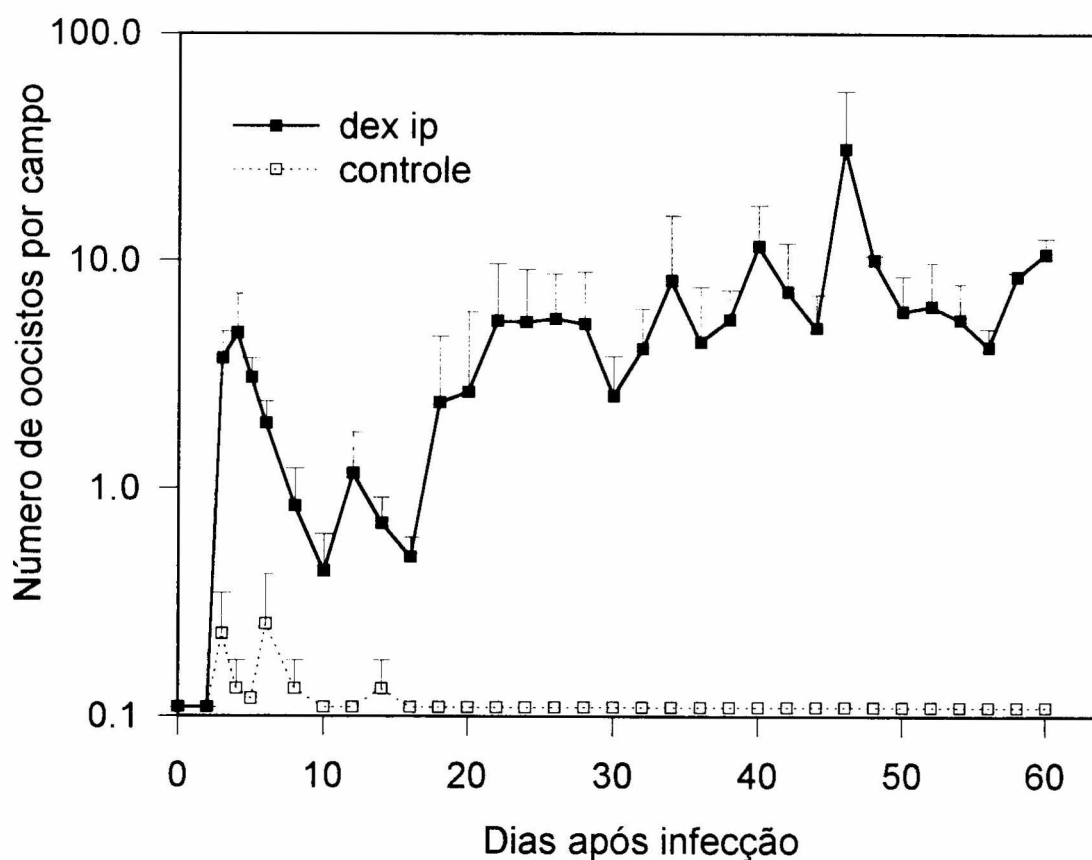
#### 4.1.1. Camundongos imunossuprimidos com dexametasona

Independente da via de administração (intraperitoneal ou oral), a infecção foi estabelecida em todos os camundongos C57BL/6 tratados com dexametasona. Os camundongos tratados com dexametasona por via oral excretaram poucos oocistos por no máximo 32 dias (Figura 1). Após esse período, os animais continuaram a ser acompanhados quanto à eliminação de oocistos nas fezes, durante 60 dias para se certificar do término da infecção (dados não mostrados). Os camundongos tratados com dexametasona por via intraperitoneal excretaram quantidades maiores de oocistos nas fezes durante todo o experimento (62 dias), com picos de eliminação a cada cinco a sete dias (Figura 2). Nos dois grupos a excreção de oocistos teve início em torno do terceiro dia após inoculação. Os camundongos que receberam dexametasona por via oral mostraram médias inferiores a um oocisto por campo e os animais injetados com dexametasona por via intraperitoneal mostraram intensidade de eliminação de oocistos variável, aumentando gradativamente com o tempo de infecção o número de oocistos nas fezes, chegando ao máximo de 32 oocistos por campo após 44 dias. Os dados obtidos nestes dois grupos estão representados na mesma escala na Figura 3. Não foram observadas no primeiro mês anormalidades clínicas. Subseqüentemente, ocorreram

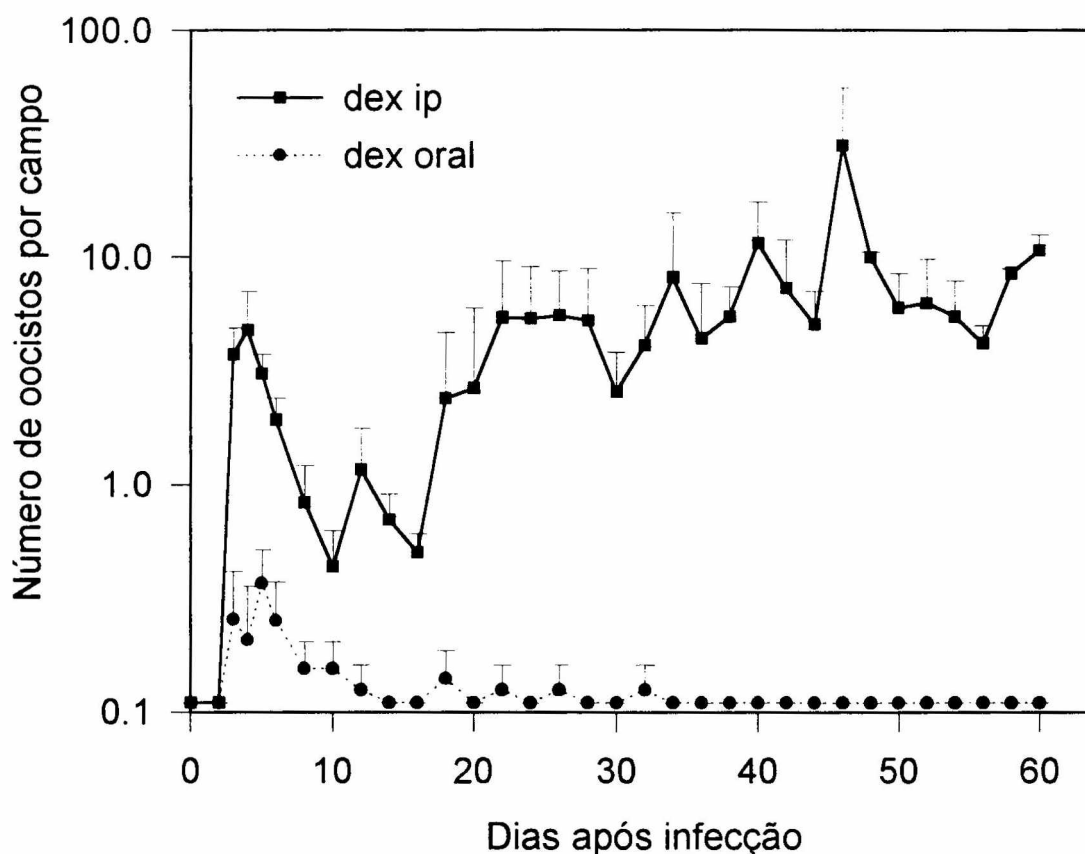




**FIGURA 1** - Excreção de *C. parvum* em camundongos C57BL/6 tratados com 5 $\mu$ g de dexametasona por via oral (dex oral) ou com salina (controle). Os camundongos foram tratados com a droga diariamente, durante 14 dias, seguido da inoculação intragástrica de 10<sup>6</sup> oocistos. Amostras fecais foram analisadas através de imunofluorescência indireta, e a média do número de oocistos por campo foi avaliada examinando-se 20 campos microscópicos (aumento de 400 x). As barras verticais representam o desvio padrão da média de três a oito camundongos.



**FIGURA 2** - Excreção de *C. parvum* em camundongos C57BL/6 tratados com dexametasona por via intraperitoneal (dex ip) ou com salina (controle). Os camundongos foram injetados com 125 $\mu$ g da droga por via intraperitoneal diariamente, durante 14 dias, seguido da inoculação intragástrica de 10<sup>6</sup> oocistos. Amostras fecais foram analisadas através de imunofluorescência indireta, e a média do número de oocistos por campo foi avaliada examinando-se 20 campos microscópicos (aumento de 400 x). As barras verticais representam o desvio padrão de três a oito camundongos. Note que uma escala logarítmica foi utilizada nas ordenadas, devido a elevada diferença na intensidade de eliminação de oocistos observada entre os grupos experimental e o controle.



**FIGURA 3** - Excreção de *C.parvum* em camundongos C57BL/6 tratados com dexametasona por via intraperitoneal (dex ip) ou oral (dex oral). As concentrações da droga administradas e a avaliação do número de oocistos eliminados nas fezes estão detalhadas nas legendas das figuras 1 e 2. Note que uma escala logarítmica foi utilizada nas ordenadas, devido a elevada diferença na intensidade de eliminação de oocistos observada entre os dois grupos experimentais.

desidratação, perda de peso, letargia e eliminação de fezes pastosas no grupo recebendo dexametasona por via intraperitoneal. Dois camundongos morreram aos 48 dias de infecção e os demais foram sacrificados no final do experimento (62 dias).

Em todos os animais que receberam dexametasona por via intraperitoneal pode ser observada colonização do íleo pelo *Cryptosporidium* em cortes de tecido corados pela HE. Além disso, o duodeno, o jejuno, o ceco e o cólon também mostraram-se infectados, porém em menor grau de intensidade (Tabela I). Não foram observadas localizações extraintestinais (estômago, fígado, vesícula biliar e pulmão), com exceção de um animal que apresentou, no corte de estômago, alguns parasitos na região da válvula pilórica. As superfícies intestinais, intensamente colonizadas por *Cryptosporidium*, mostraram diferentes estádios do parasito infectando as vilosidades (Figura 4).

Camundongos dos grupos controles (animais recebendo salina por via oral ou através de injeções intraperitoneais), e camundongos recebendo dexametasona via oral, exibiram raros oocistos nas fezes (média de excreção inferior a um parasito/campo em 10 a 20 campos observados) por no máximo 14 dias (Figuras 1 e 2), não havendo diferenças estatísticas entre estes três grupos, com exceção do valor no dia 5 pós-infecção do grupo recebendo dexametasona por via oral, que foi significativamente mais alto do que o do grupo controle ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon). O exame das secções intestinais 16 dias após inoculação e no final do experimento, não revelou colonização tecidual pelo *Cryptosporidium* nem nos grupos controle

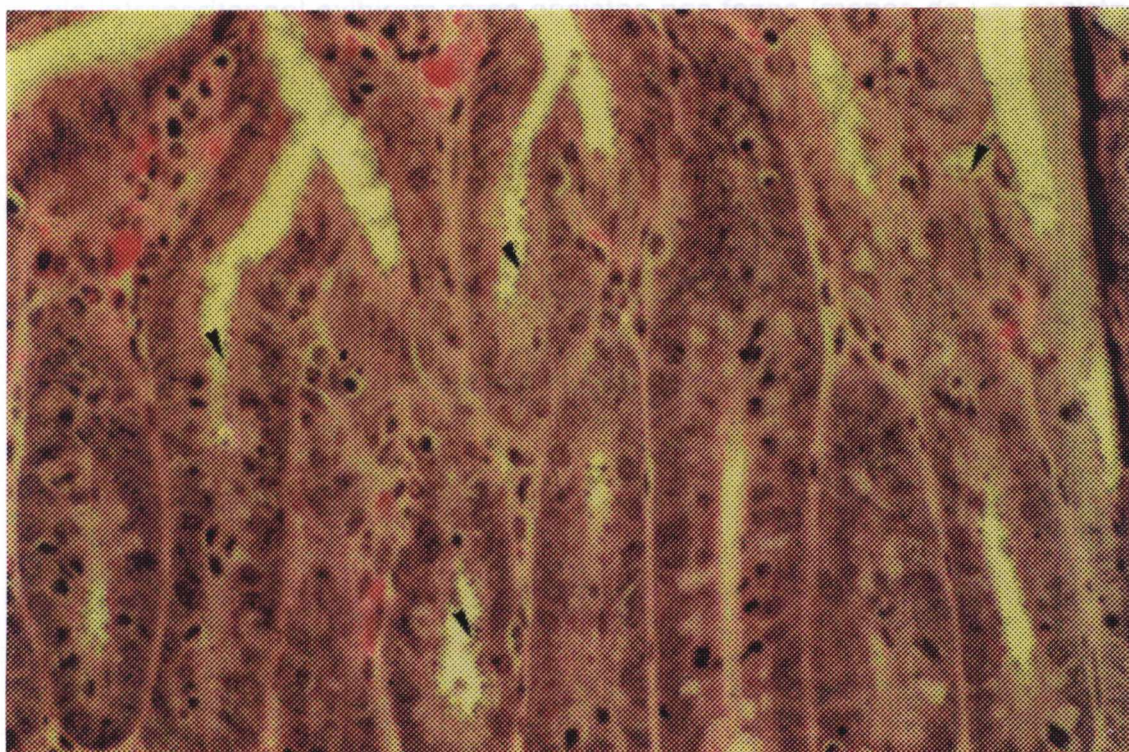
**TABELA I - Intensidade de colonização por *C.parvum* em amostras intestinais de camundongos C57BL/6 tratados com dexametasona por via intraperitoneal e inoculados com  $10^6$  oocistos<sup>a</sup>.**

SECÇÕES	ANIMAIS			
	1	2	3	4
duodeno	+ <sup>b</sup>	-	+	-
jejuno	+	-	+	+
íleo	+++	+++	+++	+++
ceco	++	+	+	++
cólon	+	+	+	+

<sup>a</sup>Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina e analisados através de microscopia óptica em um aumento de 400x.

<sup>b</sup>Intensidade da infecção:

- = sem colonização pelo parasito
- + = poucos parasitos distribuídos focalmente (<10% de tecido colonizado)
- ++ = número moderado de parasitos (10 a 50% de tecido colonizado)
- +++ = número elevado de parasitos amplamente distribuídos (>50% de tecido colonizado)



Embora tenham recebido o mesmo inóculo ( $10^6$  oocistos), os resultados diferem quanto ao número de parasitos quando

**FIGURA 4** - Corte de íleo de camundongo C57BL/6 imunossuprimido com dexametasona por via intraperitoneal ( $125 \mu\text{g}/\text{dia}$ ) e infectado com  $10^6$  oocistos de *C. parvum*. As células epiteliais das criptas e das vilosidades apresentam colonização pelo parasito (hematoxilina-eosina, aumento de  $500 \times$ ). Estádios evolutivos do parasito estão indicados por setas.

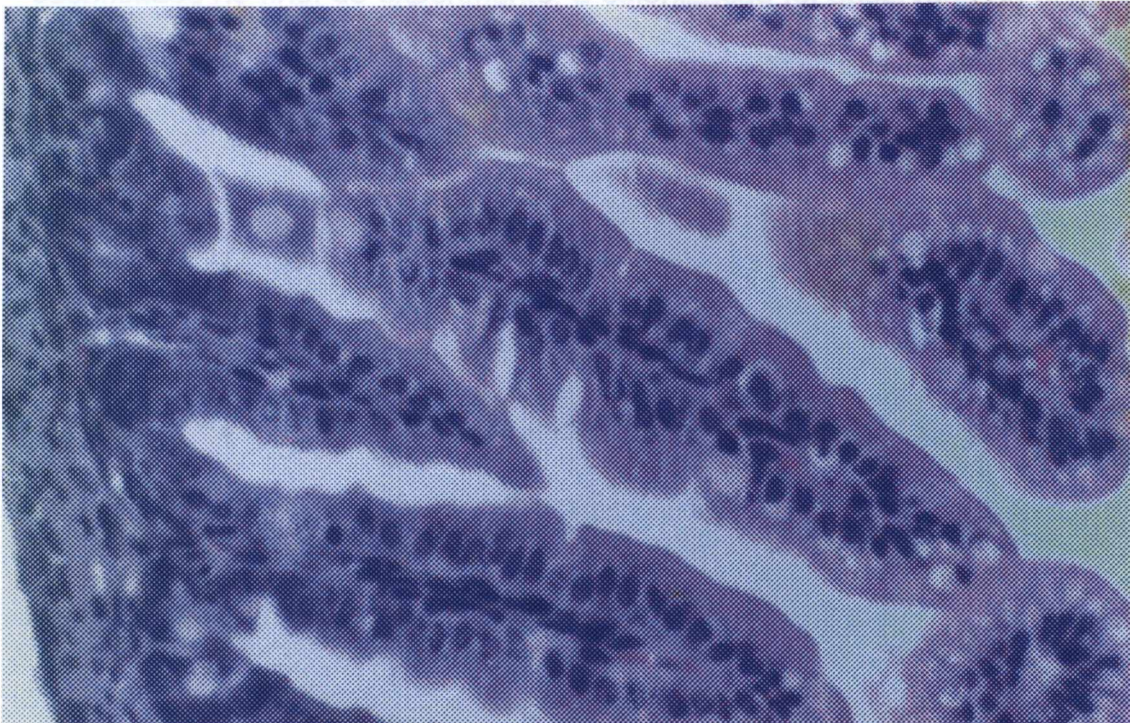
nem nos camundongos recebendo dexametasona por via oral (Figura 5). Não foram observados sinais clínicos devido à criptosporidiose.

Os camundongos BALB/c tratados com dexametasona por via oral não desenvolveram infecção após a inoculação com oocistos de *C. parvum*. O exame de fezes e o exame histológico de secções de intestino foram negativos durante todo o experimento. Metade dos animais recebendo dexametasona por via intraperitoneal exibiram raros oocistos nas fezes (menos de um oocisto por campo), cessando a eliminação dentro de duas semanas. O exame histológico de secções intestinais, realizado no 14º dia após inoculação, não demonstrou colonização pelo parasito (dados não mostrados).

Os experimentos para avaliação da intensidade da infecção em animais imunossuprimidos com dexametasona foram repetidos uma vez, apresentando boa reprodutibilidade dos resultados e, sendo compatíveis com os dados da literatura.

#### 4.1.2. Camundongos SCID

Embora tenham recebido o mesmo inóculo ( $10^6$  oocistos), os camundongos SCID excretaram números inferiores de parasitos quando comparados aos camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dexametasona, tendo a excreção máxima sido de aproximadamente 5 oocistos por campo durante toda a infecção. Além disso, uma excreção significativa ( $\geq 1$  oocisto por campo) ocorreu tardiamente, cinquenta e seis dias após inoculação. A variabilidade no número de oocistos eliminados em diferentes períodos da infecção foi semelhante a dos camundongos C57BL/6



**FIGURA 5** - Corte de íleo de camundongo C57BL/6 não-imunossuprimido (controle), apresentando comprimento e largura normal das vilosidades, sem alterações nas criptas e sem colonização pelo parasito (hematoxilina-eosina, aumento de 500 x).

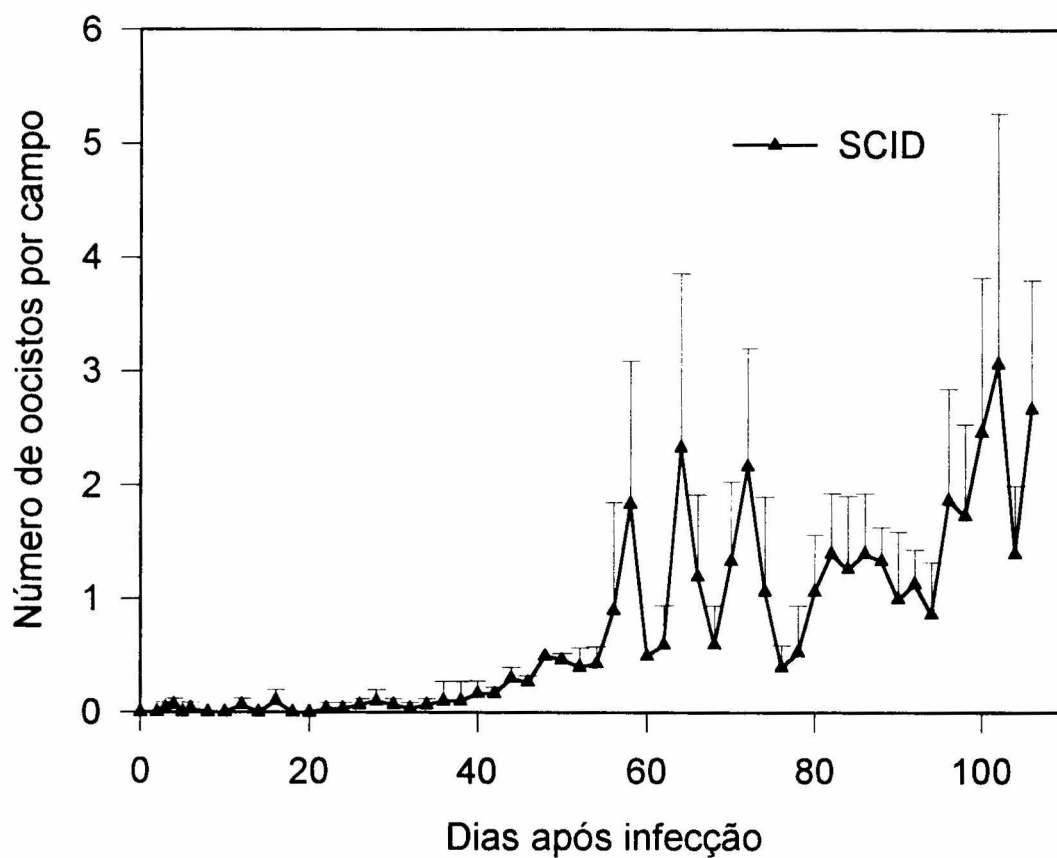


imunossuprimidos com dexametasona, ocorrendo alternância de picos de eliminação de oocistos nas fezes (Figura 6). Os animais sacrificados sessenta dias após infecção mostraram colonização apenas no íleo, com maior intensidade na porção terminal. Os camundongos que demonstraram letargia, perda de peso e sinais de desidratação (fezes ressecadas) foram sacrificados antes do final do experimento (106 dias). Nestes animais, e naqueles sacrificados no final do experimento, a colonização foi observada no duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon, sendo mais intensa no íleo (Tabela II).

Embora as amostras teciduais não tenham sido analisadas sistematicamente como o estudo de excreção de oocistos nas fezes, de maneira geral, tanto nos camundongos SCID quanto nos camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dexametasona, a intensidade de colonização do íleo, e de outras porções intestinais, foi proporcional à eliminação de parasitos nas fezes.

#### 4.1.3 Camundongos bons (H) e maus(L) produtores de anticorpos

A pesquisa de *Cryptosporidium* nas fezes de camundongos H e L pelo método de Kinyoun foi negativa durante todo o experimento (cerca de 30 dias). O exame histológico de tecidos dos animais sacrificados também foi negativo e nenhuma alteração clínica devido ao *Cryptosporidium* foi observada. A baixa viabilidade dos oocistos utilizados foi descartada pelo fato destes infectarem 100% dos animais neonatos utilizados como controle do inóculo, conforme



**FIGURA 6** - Eliminação de oocistos nas fezes de camundongos SCID inoculados com  $10^6$  oocistos de *C. parvum*. Amostras fecais foram analisadas através de imunofluorescência indireta e a média do número de oocistos por campo foi avaliada examinando-se 20 campos microscópicos (aumento de 400 x).

**TABELA II - Intensidade de colonização por *C.parvum* em amostras intestinais de camundongos SCID após inoculação com  $10^6$  oocistos<sup>a</sup>.**

SECÇÕES	ANIMAL			
	1	2	3	4
duodeno	- <sup>b</sup>	+	+	-
jejuno	+	+	+	-
íleo	++	++	++	++
ceco	+	+	+	+
cólon	-	+	+	-

<sup>a</sup>Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina e analisados através de microscopia óptica em um aumento de 400x.

<sup>b</sup>Intensidade da infecção:

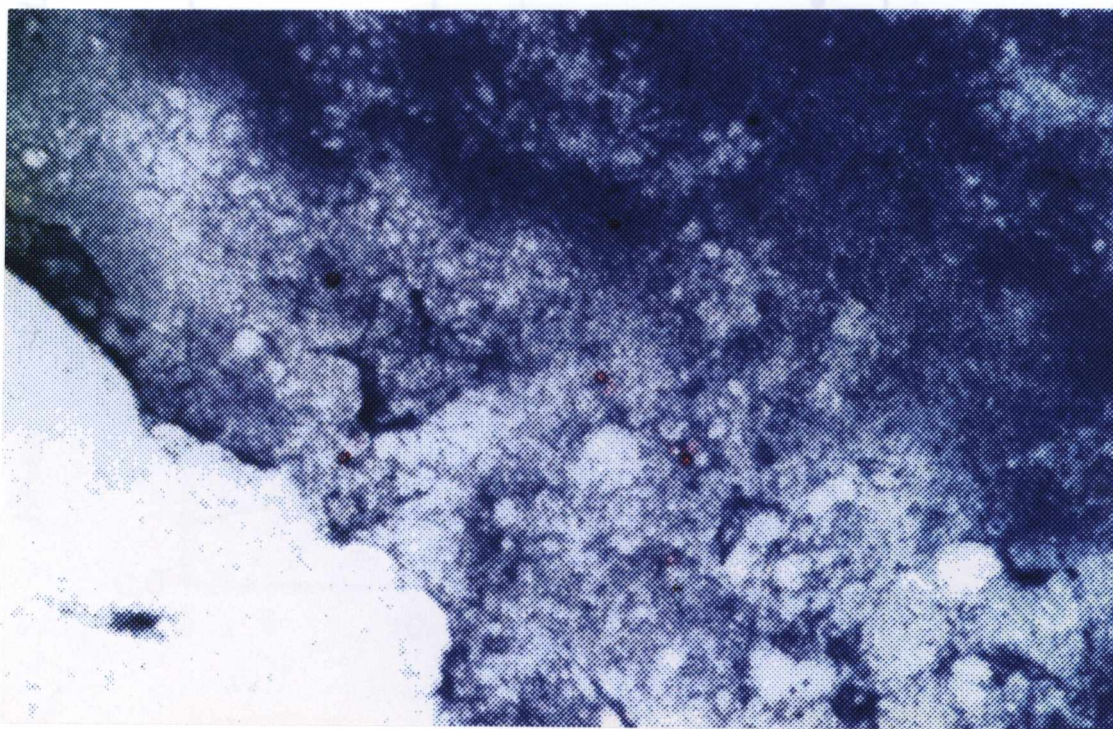
- = sem colonização pelo parasito
- + = poucos parasitos distribuídos focalmente (<10% de tecido colonizado)
- ++ = número moderado de parasitos (10 a 50% de tecido colonizado)
- +++ = número elevado de parasitos amplamente distribuídos (>50% de tecido colonizado)

determinado pela presença de oocistos no conteúdo intestinal destes animais no oitavo dia após infecção (Fig. 7).

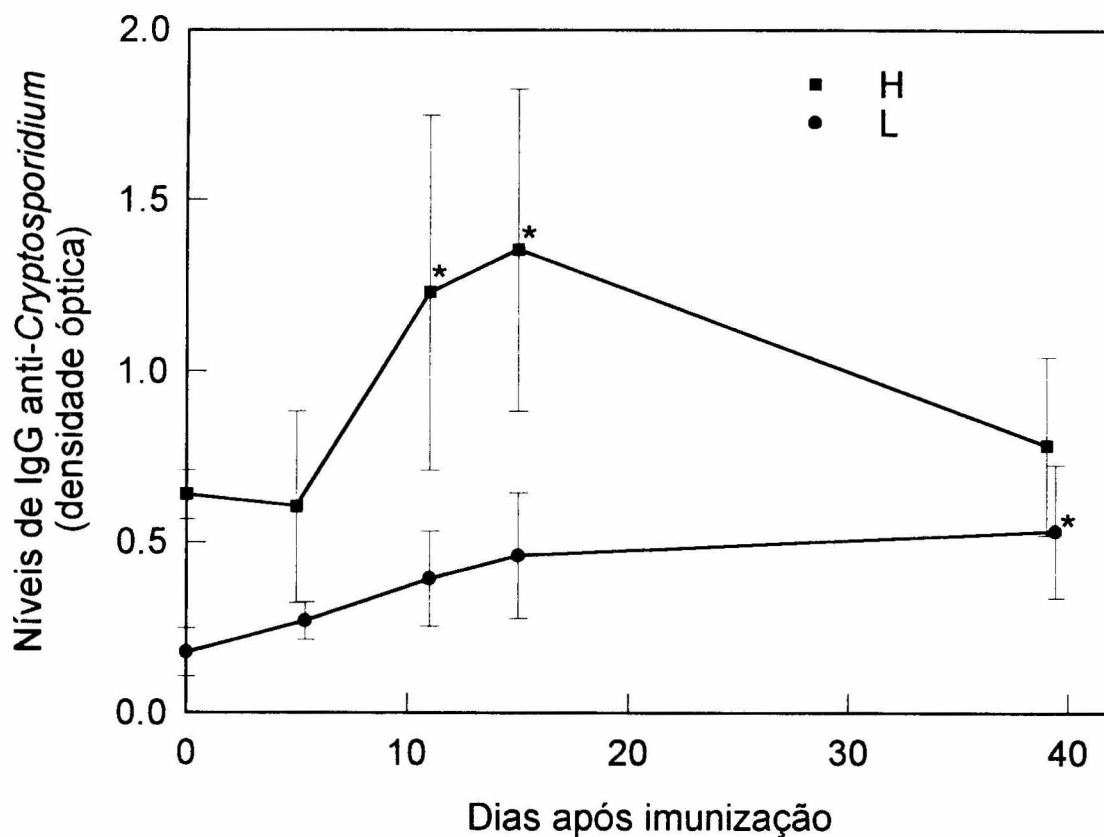
#### 4.1.4. Estudo da resposta imune humoral anti-*Cryptosporidium* em linhagens H e L e em camundongos BALB/c e C57BL/6

Para estudar a resposta imune humoral ao *Cryptosporidium* em camundongos selecionados para a boa e má resposta de anticorpo, animais de três seleções foram imunizados intraperitonealmente com lisado de *C. parvum* associado ao hidróxido de alumínio, ou inoculados com oocistos vivos.

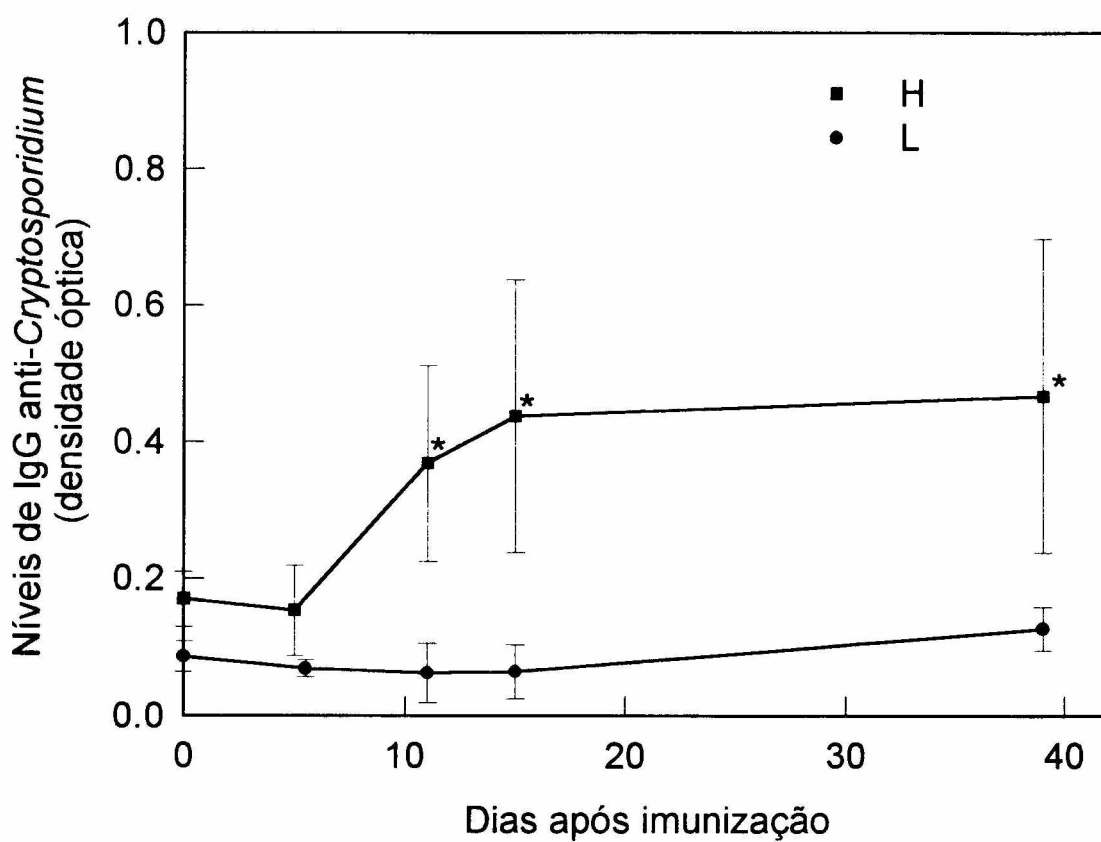
Os níveis de IgG anti-*Cryptosporidium* após imunização com antígenos do protozoário foram significativamente ( $p < 0,05$ ; teste não paramétrico de Wilcoxon) elevados em todas as linhagens boas-produtoras de anticorpos (Figuras 8-10). Os níveis máximos foram observados nos camundongos H<sub>IVa</sub>, 15 dias pós-imunização, estando os níveis mais baixos 39 dias pós-imunização (Figura 8). Não ocorreram aumentos significativos dos níveis de anticorpos na co-linhagem L<sub>IVa</sub>, apesar de uma tendência ascendente da curva (Figura 8;  $p < 0,05$  no 39º dia após imunização; teste não paramétrico de Wilcoxon), nas linhagens má-respondedora L<sub>GS</sub> (Figura 9), má-respondedora L<sub>GP</sub> e geração F<sub>1</sub> entre H<sub>GP</sub> e L<sub>GP</sub> (Figura 10). Anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* foram produzidos por camundongos BALB/c e por camundongos C57BL/6, apresentando níveis mais elevados pelos primeiros (Figura 11).



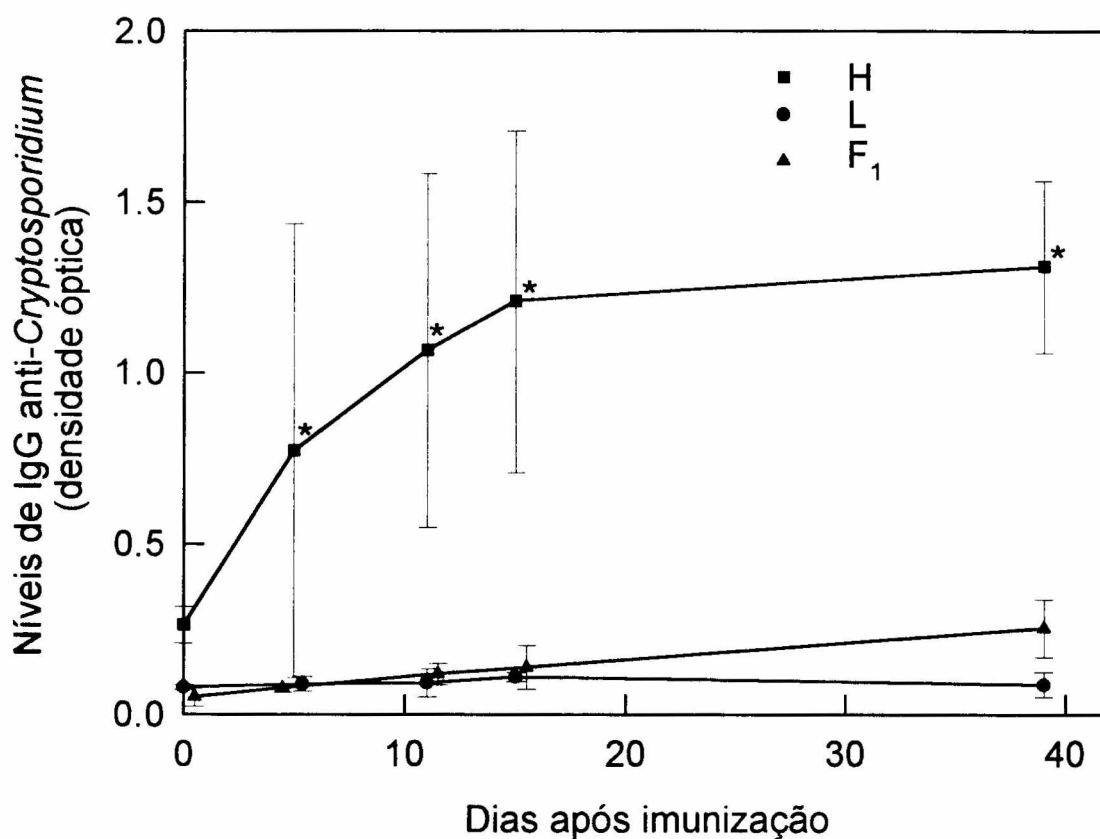
**FIGURA 7** - Esfregaço de conteúdo intestinal de camundongo BALB/c neonato infectado com *C. parvum*. O camundongo foi inoculado com  $10^4$  oocistos por via oral. Após 8 dias o animal foi sacrificado e o conteúdo intestinal foi corado pelo método de Kinyoun. Oocistos podem ser vistos como pequenos círculos vermelhos contra um fundo azulado de bactérias e outros detritos (aumento de 400 x).



**FIGURA 8** - Avaliação da resposta de IgG anti-*C. parvum* em camundongos H e L da seleção IVa através de ELISA, após injeção intraperitoneal com 40 $\mu$ g de antígeno. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).

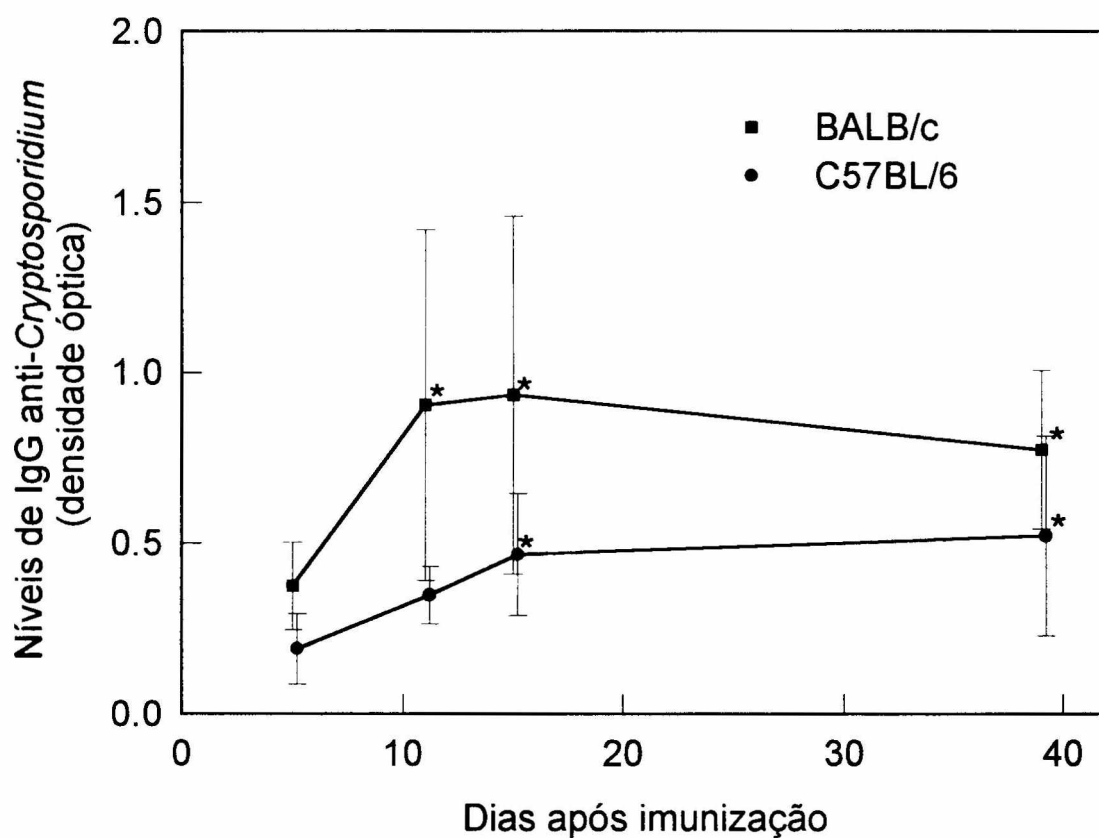


**FIGURA 9** - Avaliação da resposta de IgG anti-*C. parvum* em camundongos H e L da seleção GS através de ELISA, após injeção intraperitoneal com 40 $\mu$ g de antígeno. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).



**FIGURA 10** - Avaliação da resposta de IgG anti-*C. parvum* em camundongos H, L e F<sub>1</sub> da seleção GP através de ELISA, após injeção intraperitoneal com 40 $\mu$ g de antígeno. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).

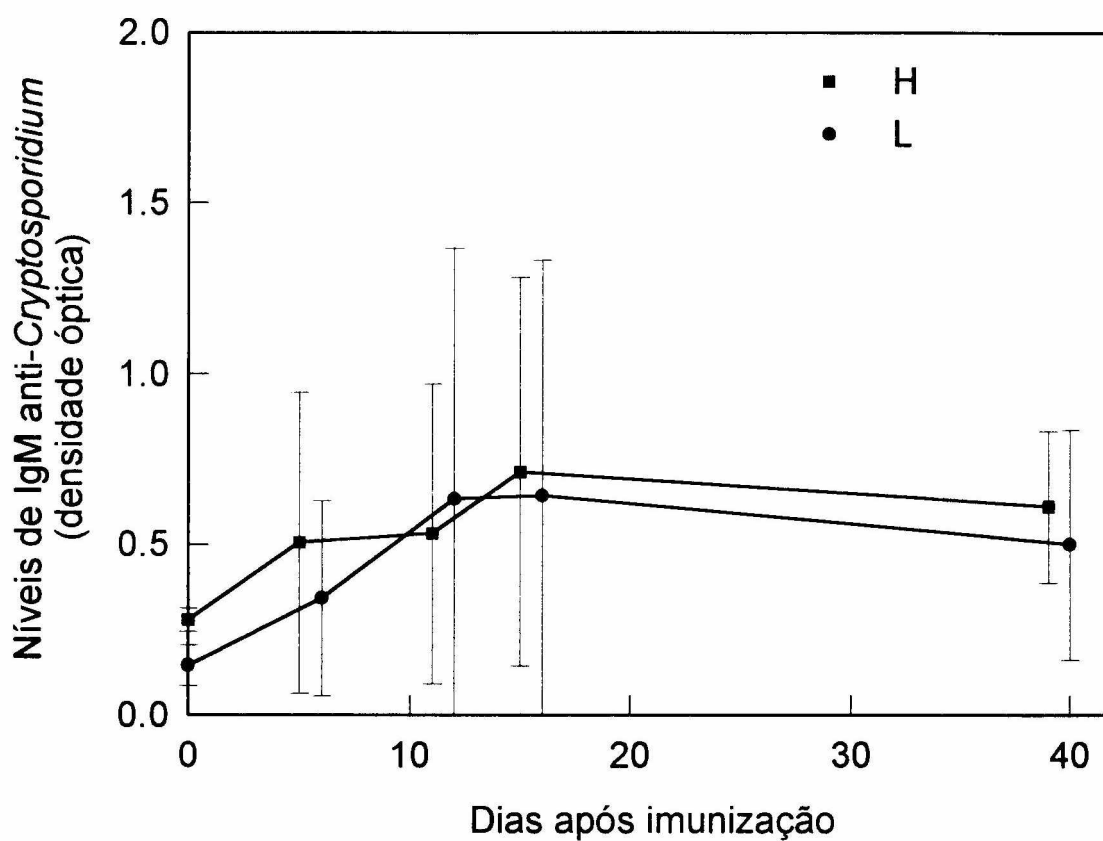




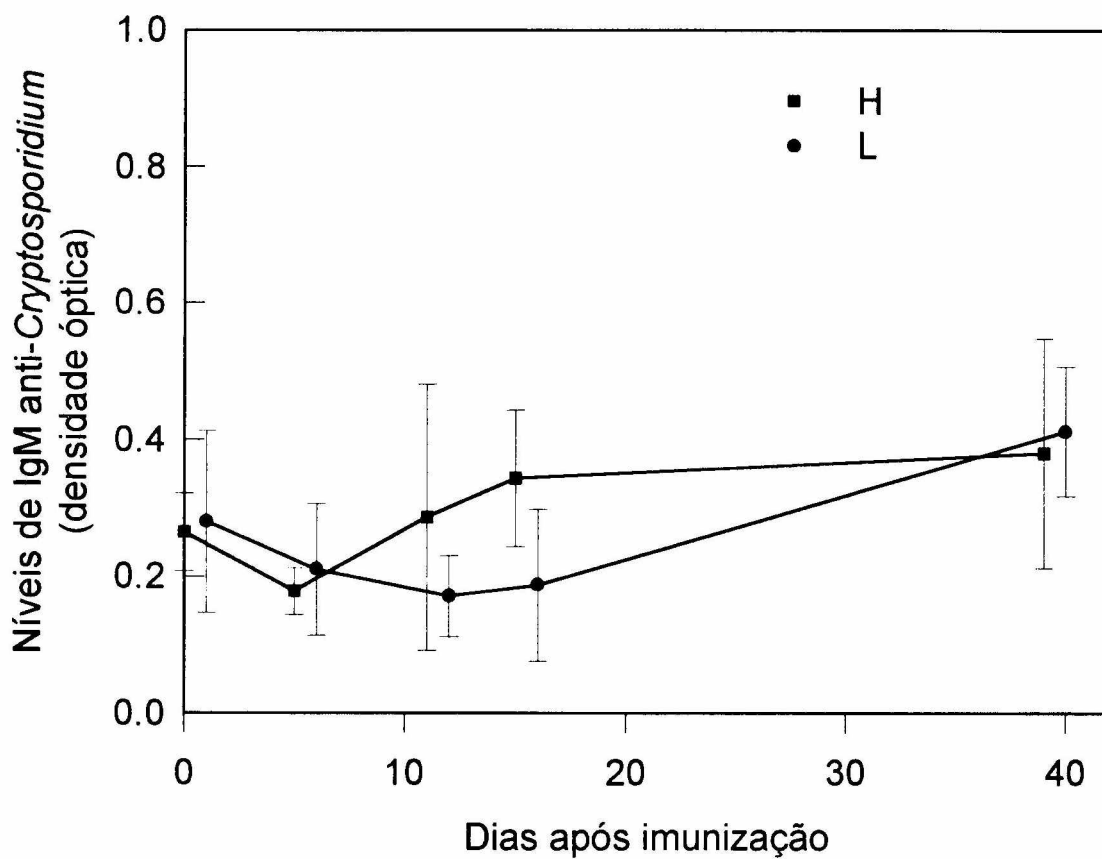
**FIGURA 11** - Avaliação da resposta de IgG anti-*C. parvum* em camundongos BALB/c e C57BL/6 através de ELISA, após injeção intraperitoneal com 40 $\mu$ g de antígeno. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 5 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).

Quanto à produção de IgM, foi observado um aumento dos níveis de anticorpo na linhagem má-produtora  $L_{IVa}$ , enquanto que a linhagem boa-produtora  $H_{IVa}$  mostrou níveis elevados antes da imunização, sem ocorrer alteração significativa dos mesmos (Figura 12). As co-linhagens  $H_{GS}$  e  $L_{GS}$  mostraram uma produção tardia de IgM, apresentando aproximadamente o triplo dos níveis de IgM anti-*Cryptosporidium* aos 39 dias pós-imunização, comparados com aqueles obtidos no dia zero (Figura 13). Já os camundongos  $H_{GP}$  mostraram um aumento rápido da resposta de IgM em relação aos soros colhidos antes da injeção de antígeno, porém sem apresentar alterações nos títulos aos 11 dias pós-imunização (Figura 14). Nos camundongos  $L_{GP}$  e os da geração  $F_1$ , entre  $H_{GP}$  e  $L_{GP}$  houve um aumento mais tardio e discreto, porém estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ; teste não paramétrico de Wilcoxon), dos níveis de anticorpo IgM (Figura 14). Níveis de IgM anti-*Cryptosporidium* foram bastante elevados nos camundongos BALB/c (Figura 15). Os camundongos C57BL/6 não responderam com a produção de IgM anti-*Cryptosporidium* (Figura 15).

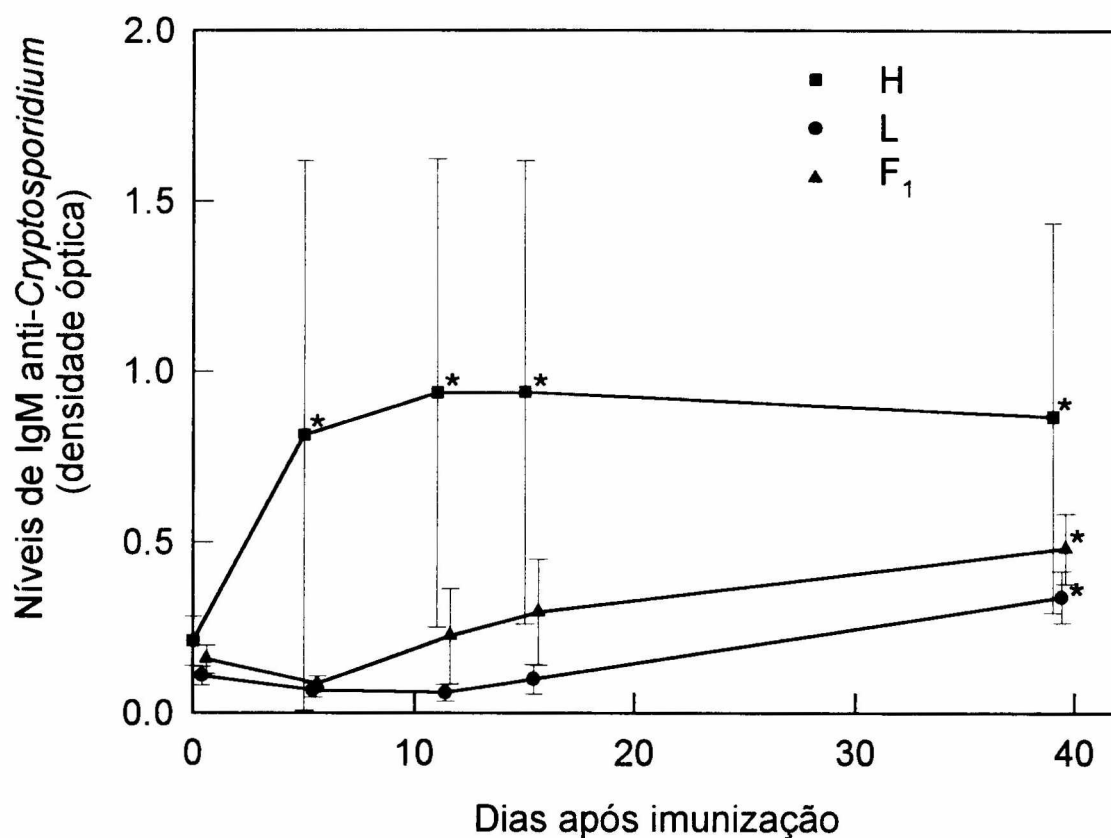
As diferenças dos níveis de anticorpos anti-*Cryptosporidium* entre as linhagens H e L, e entre os camundongos BALB/c e C57BL/6, estão sumarizadas na Tabela III, juntamente com os indicadores de resposta à seleção e de dominância. Exceto a seleção IVa, todos os camundongos das linhagens H produziram níveis de IgG significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ; teste não paramétrico de Wilcoxon) que as linhagens L (Tabela III). Em termos de IgM foram observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ; teste não paramétrico de Wilcoxon) apenas entre linhagens H e L da seleção GP (Tabela III). As respostas de IgM e IgG anti-*Cryptosporidium* dos



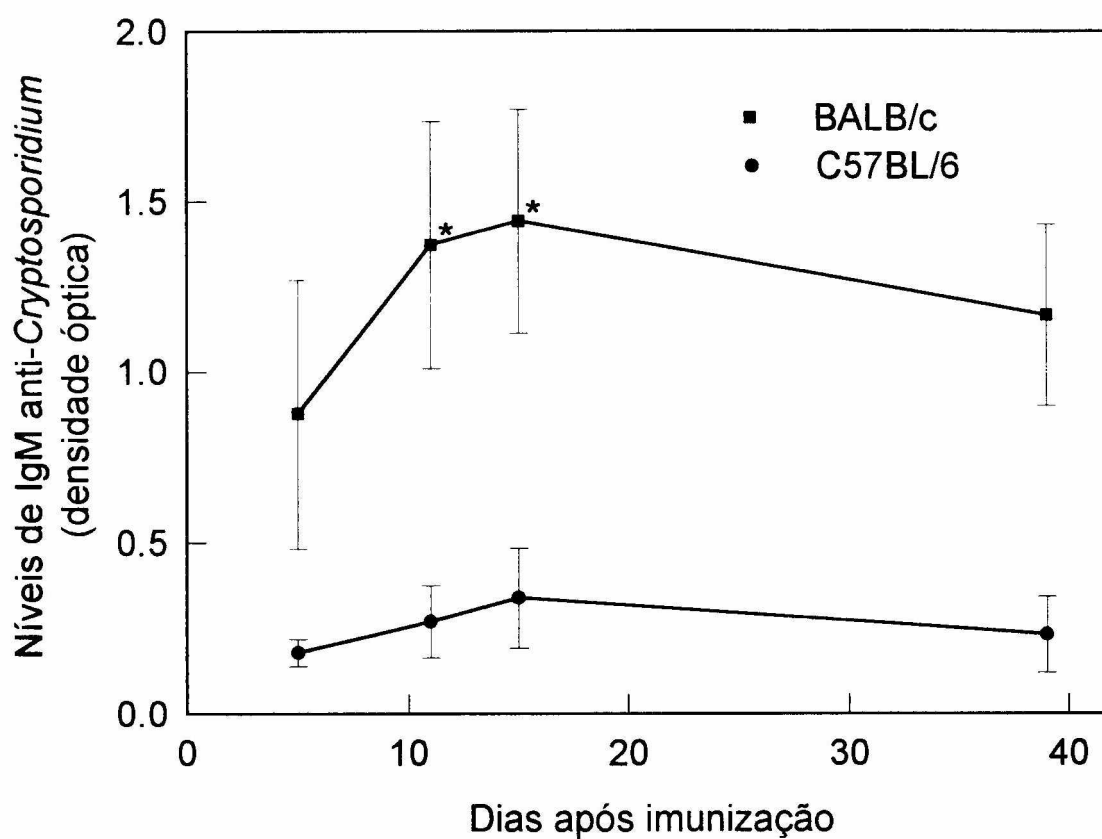
**FIGURA 12** - Avaliação da resposta de IgM anti-*C. parvum* em camundongos H e L da seleção IVa através de ELISA, após injeção intraperitoneal com 40 $\mu$ g de antígeno. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).



**FIGURA 13** - Avaliação da resposta de IgM anti-*C. parvum* em camundongos H e L da seleção GS através de ELISA, após injeção intraperitoneal com 40 $\mu$ g de antígeno. Não houve variação estatisticamente significativa dos níveis de anticorpo quando comparados com os valores do dia 0.



**FIGURA 14** - Avaliação da resposta de IgM anti-*C. parvum* em camundongos H, L e F<sub>1</sub> da seleção GP através de ELISA, após injeção intraperitoneal com 40µg de antígeno. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).



**FIGURA 15** - Avaliação da resposta de IgM anti-*C. parvum* em camundongos BALB/c e C57BL/6 através de ELISA, após injeção intraperitoneal com 40 $\mu$ g de antígeno. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 5 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).

**TABELA III - Resposta de anticorpo IgM e IgG anti-*Cryptosporidium* em camundongos H e L das seleções GP, GS e IVa; geração F1GP; BALB/c e C57BL/6 imunizados com antígenos de *Cryptosporidium parvum*<sup>a</sup>**

Seleção ou raça de camundongos	Linhagem ou geração <sup>b</sup>	n <sup>c</sup>	Níveis de anticorpos <sup>d</sup> e indicadores de resposta à seleção e de dominância									
			IgM					IgG				
			Média±DPe	p <sup>f</sup>	a <sup>g</sup>	d <sup>h</sup>	d/a <sup>i</sup>	Média±DPj	p	a	d	d/a
GP	H	5	0.86±0.53		0.31	-0.22	-0.71	1.13±0.35		0.54	-0.36	-0.67
	L	5	0.24±0.07	<0.01				0.04±0.02	<0.01			
	F <sub>1</sub>	4	0.33±0.08	<0.05				0.22±0.05	<0.05			
GS	H	4	0.17±0.10		0.05			0.42±0.15		0.37		
	L	4	0.16±0.05					0.05±0.02	<0.05			
IVa	H	3	0.59±0.36		0.37			0.71±0.38		0.35		
	L	4	0.22±0.11					0.36±0.17				
BALB/c		6	1.46±0.29					1.11±0.38				
C57BL/6		4	0.34±0.12	<0.01				0.58±0.17	<0.05			

<sup>a</sup> Camundongos foram imunizados com 40µg de antígenos de *Cryptosporidium* emulsionados em gel de hidróxido de alumínio. As sangrias foram realizadas antes e 5, 11, 15 e 39 dias após imunização.

<sup>b</sup> H, camundongos bons produtores de anticorpos; L, camundongos maus produtores de anticorpos; F<sub>1</sub>, híbridos resultantes do cruzamento H x L.

<sup>c</sup> Número de camundongos em cada grupo.

<sup>d</sup> Determinado através de ELISA utilizando anticorpos anti-IgM e anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase. Os valores obtidos antes da imunização foram subtraídos dos valores apresentados na tabela.

<sup>e</sup> Média dos resultados mais elevados, expressos em densidade óptica, obtidos de cada camundongo (do dia 5 ao dia 39 pós-imunização) e desvio padrão (DP).

<sup>f</sup> Significância estatística das diferenças das linhagens L e geração F<sub>1</sub> em relação às linhagens H, e dos camundongos C57BL/6 em relação aos camundongos BALB/c, determinada através do teste não-paramétrico de Wilcoxon. Apenas valores estatisticamente significantes (p<0,05) foram anotados.

<sup>g</sup> a=efeito aditivo da resposta à seleção.

<sup>h</sup> d=dominância global (se d=0, co-dominância; se d=a, dominância completa H; se d=-a, dominância completa L).

<sup>i</sup> d/a=efeito da dominância global (se d/a=0, co-dominância; se d/a=1, dominância completa H; se d/a=-1, dominância completa L).

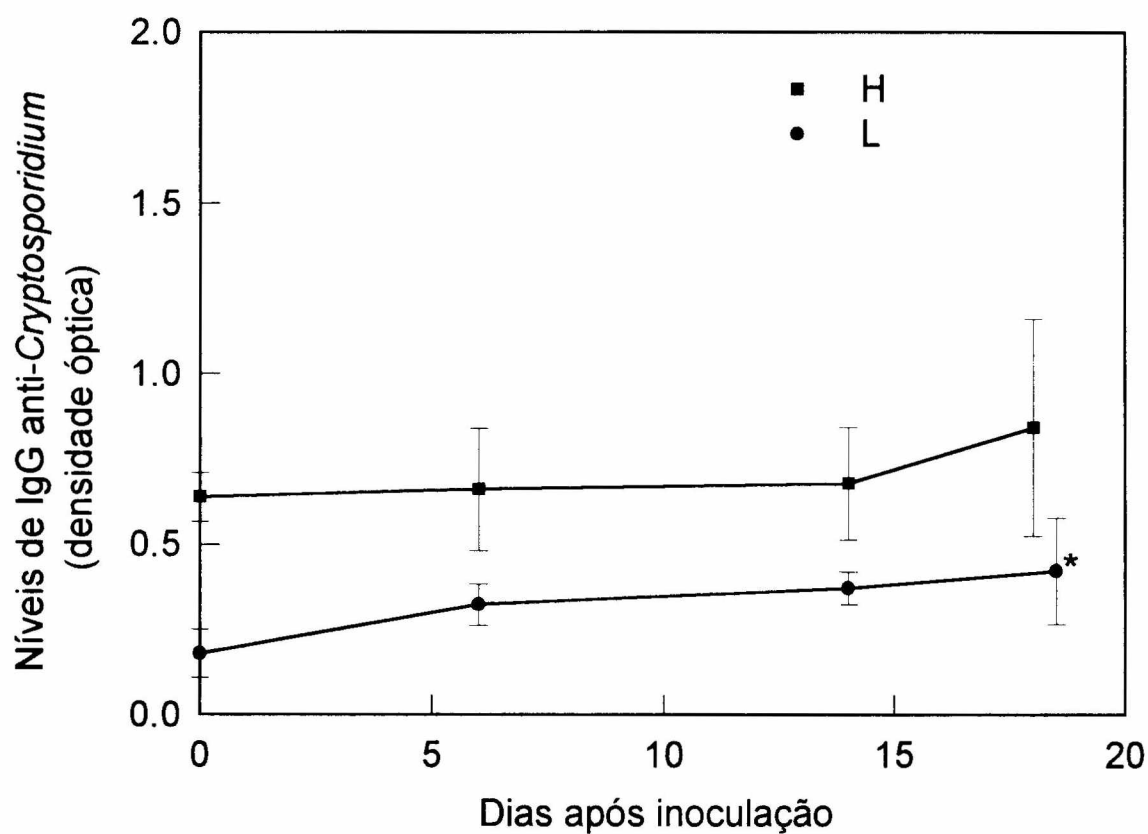
<sup>j</sup> Média dos resultados mais elevados, expressos em densidade óptica, obtidos de cada camundongo (do dia 11 ao dia 39 pós-imunização) e desvio padrão (DP).

camundongos  $F_1$  híbridos ( $H_{GP} \times L_{GP}$ ) foram intermediárias entre as linhagens  $H_{GP} \times L_{GP}$ , porém mais próximas daquelas observadas nas linhagens más-produtoras de anticorpo (Tabela III). Camundongos BALB/c produziram níveis significativamente mais elevados de anticorpos anti- *Cryptosporidium* que os camundongos C57BL/6 (Tabela III).

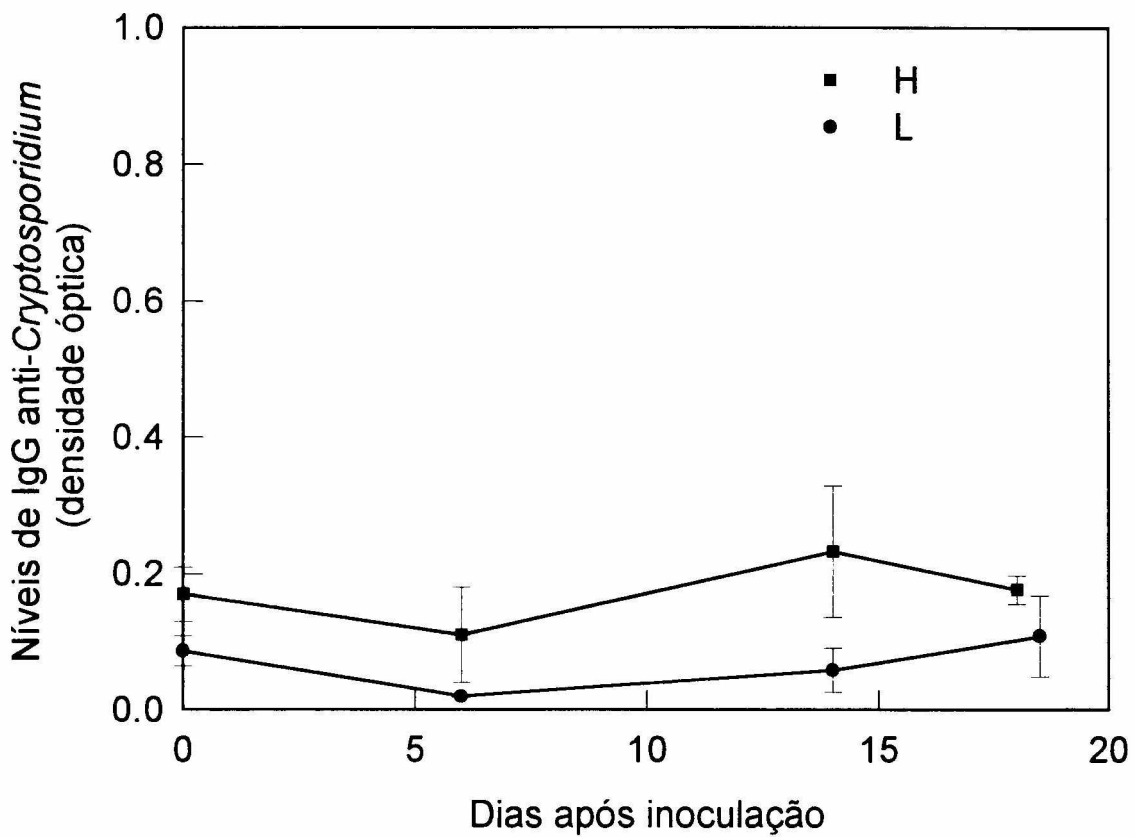
A resposta de IgG anti-*Cryptosporidium* em camundongos inoculados com oocistos vivos foi muito baixa ou inexistente em todas as linhagens estudadas (Figuras 16-18). Os camundongos bons respondedores de todas as três seleções (GP, GS e IVa) apresentaram mesmo antes da inoculação, níveis de anticorpos IgG significativamente mais altos do que os camundongos maus respondedores ( $p < 0,05$  para todas as seleções; teste não-paramétrico de Wilcoxon). No entanto, a única linhagem em que ocorreu um aumento pequeno, mas estatisticamente significativo dos níveis destes anticorpos após a inoculação foi a  $L_{IVa}$  (Figura 16).

Em termos de resposta de IgM, houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon), de anticorpos anti-*Cryptosporidium*, em amostras coletadas após 15 dias, em todas as linhagens boas-produtoras de anticorpos (Figuras 19-21). Níveis de anticorpos elevados antes da inoculação de oocistos foram observados nas seleções  $H_{IVa}$  (Figura 19),  $H_{GS}$ ,  $L_{GS}$  (Figura 20) e  $H_{GP}$  (Figura 21). Houve uma tendência a haver uma redução destes níveis nos primeiros dias de inoculação sendo que os níveis estavam significativamente mais baixos no dia 6 pós-infecção na seleção  $L_{GS}$  (Figura 20) e na seleção  $H_{GP}$  (Figura 21). Os camundongos bons-respondedores  $H_{IVa}$  e  $H_{GS}$ , no entanto, tinham níveis de anticorpo significativamente ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon) mais altos que

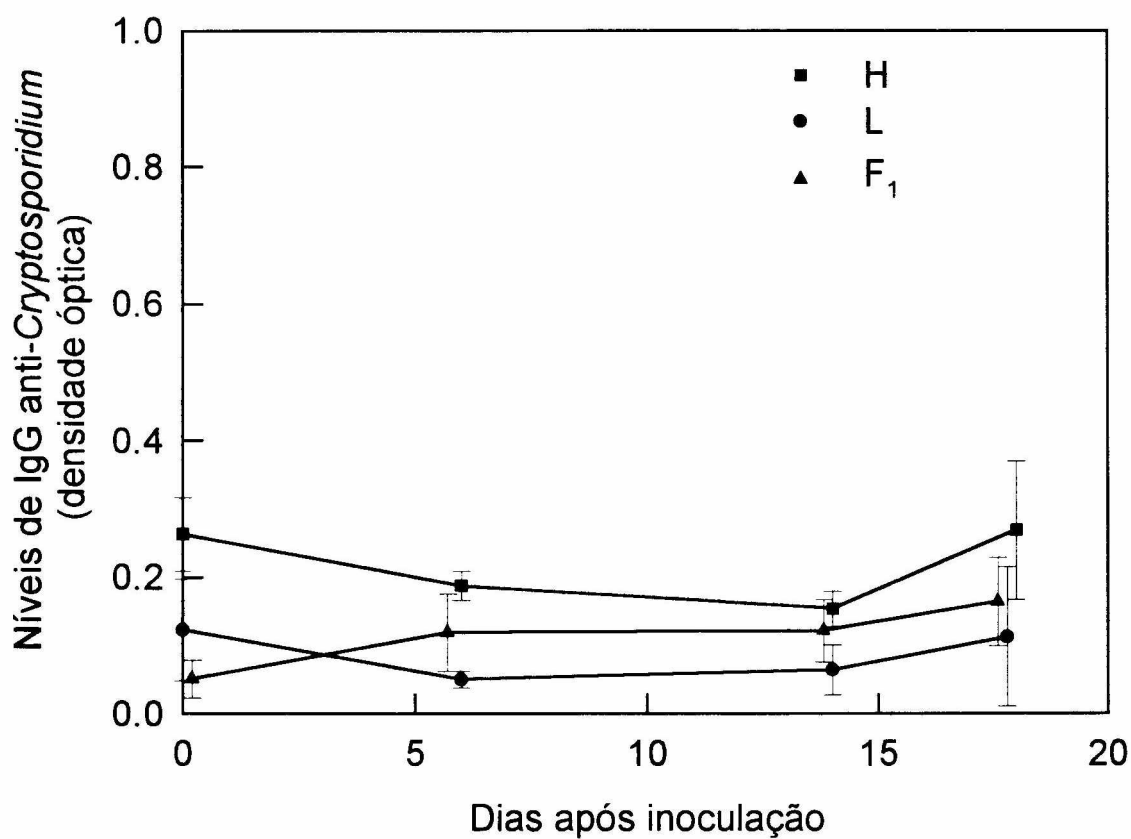




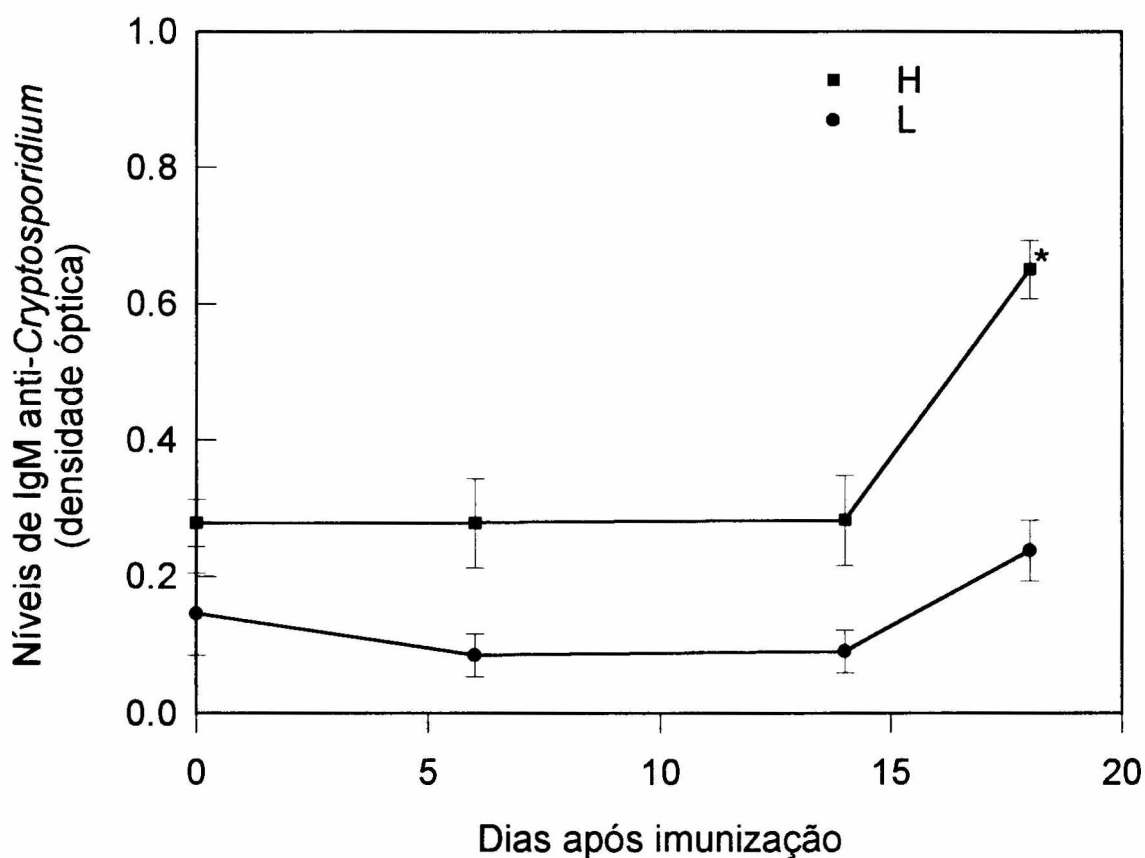
**FIGURA 16** - Avaliação da resposta de IgG anti-*C. parvum* em camundongos H e L da seleção IVa através de ELISA, após inoculação intragástrica com  $10^6$  oocistos. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).



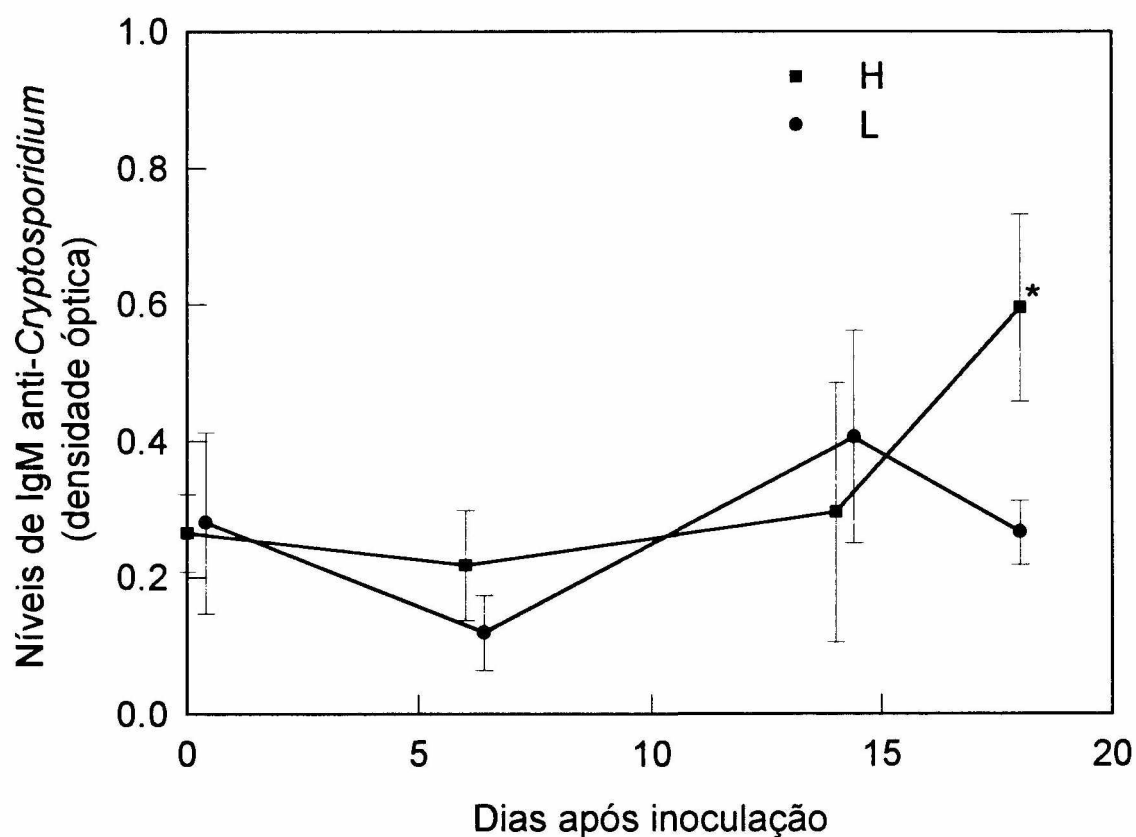
**FIGURA 17** - Avaliação da resposta de IgG anti-*C. parvum* em camundongos H e L da seleção GS através de ELISA, após inoculação intragástrica com  $10^6$  oocistos. Não houve variação estatisticamente significativa dos níveis de anticorpo quando comparados com os valores do dia 0.



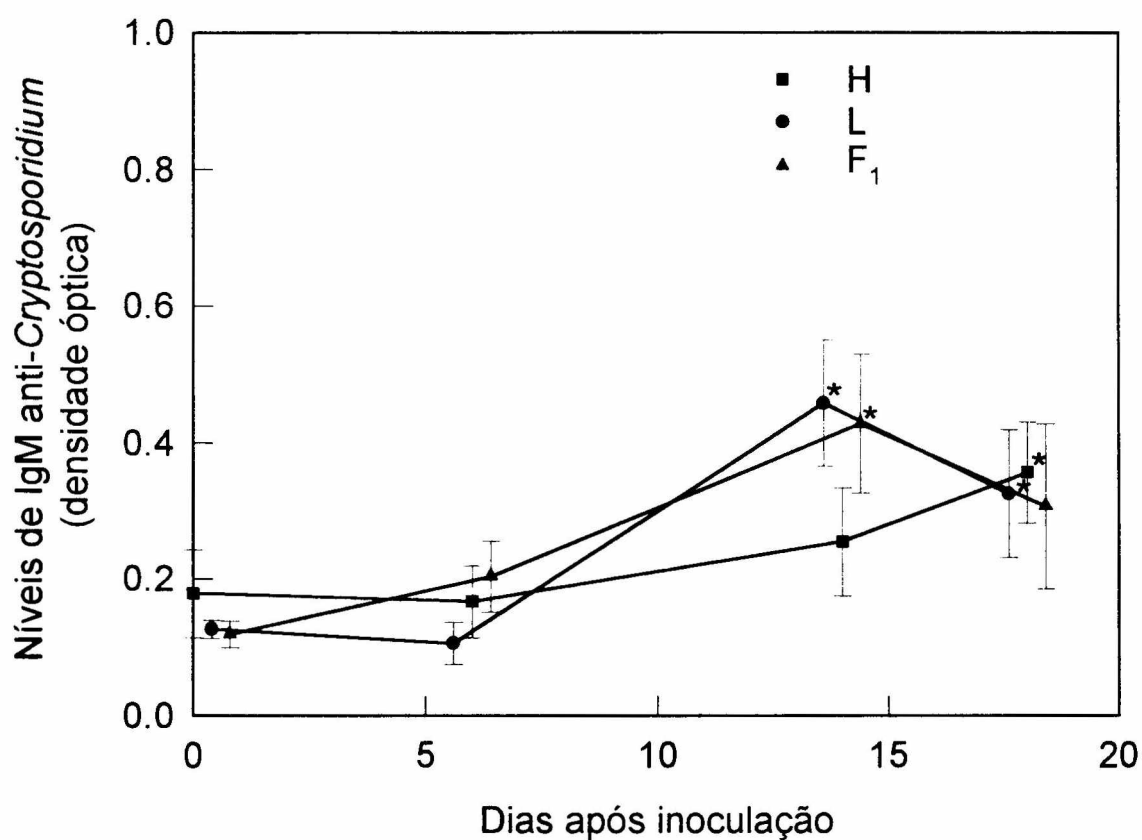
**FIGURA 18** - Avaliação da resposta de IgG anti-*C. parvum* em camundongos H, L e F<sub>1</sub> da seleção GP através de ELISA, após inoculação intragástrica com  $10^6$  oocistos. Não houve variação estatisticamente significativa dos níveis de anticorpo quando comparados com os valores do dia 0.



**FIGURA 19** - Avaliação da resposta de IgM anti-*C. parvum* em camundongos H e L da seleção IVa através de ELISA, após inoculação intragástrica com  $10^6$  oocistos. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).



**FIGURA 20** - Avaliação da resposta de IgM anti-*C. parvum* em camundongos H e L da seleção GS através de ELISA, após inoculação intragástrica com  $10^6$  oocistos. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon).



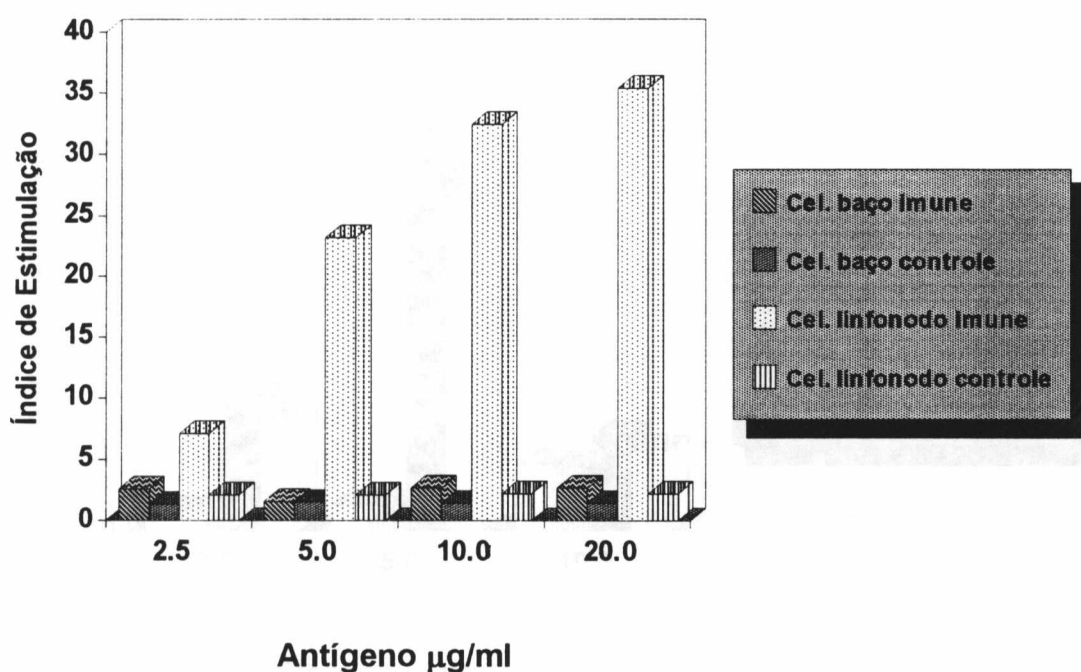
**FIGURA 21** - Avaliação da resposta de IgM anti-*C. parvum* em camundongos H, L e F<sub>1</sub> da seleção GP através de ELISA, após inoculação intragástrica com 10<sup>6</sup> oocistos. Os asteriscos ao lado dos símbolos indicam resultados estatisticamente significantes em relação aos valores observados no dia 0 (p < 0,05; teste não-paramétrico de Wilcoxon).

as co-linhagens más-respondera  $L_{IVa}$  e  $L_{GS}$  no dia 18 após a inoculação (Figuras 19-21), não havendo, no entanto, diferenças significativas entre as co-linhagens boa-produtora  $H_{GP}$ , má produtora  $L_{GP}$  e o grupo de camundongos híbridos da geração  $F_1$  entre essas duas últimas linhagens (Figura 21).

## 4.2. ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE LINFÓCITOS T ESPECÍFICOS PARA *Cryptosporidium* E CLONAGEM

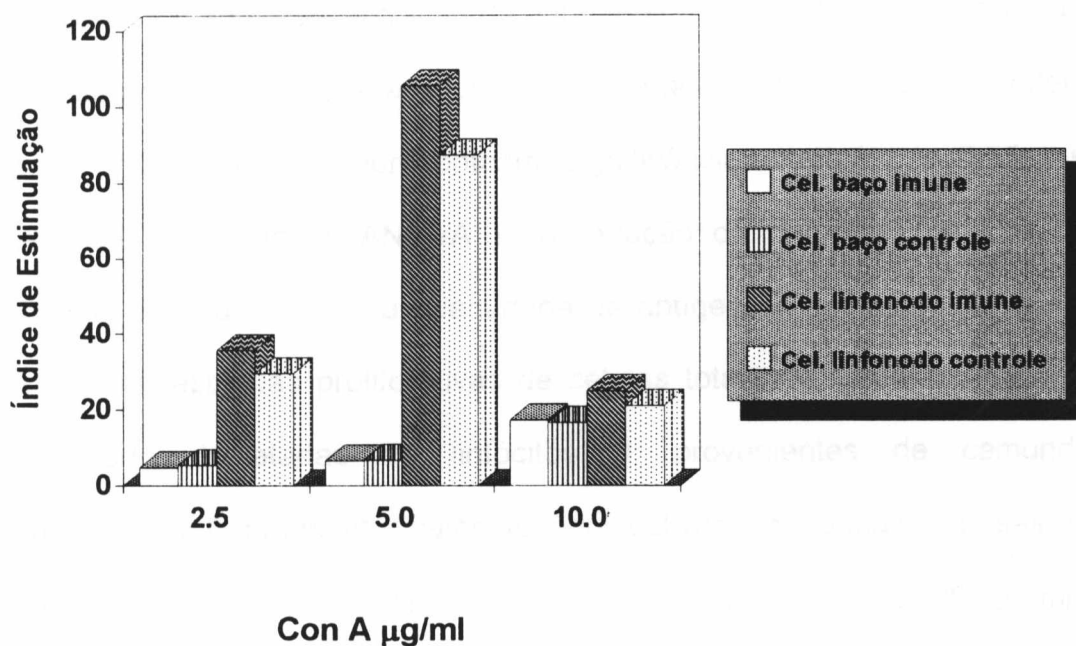
### 4.2.1. Resposta linfoproliferativa a antígenos de *Cryptosporidium*

Uma curva dose/resposta blastogênica foi realizada para se determinar a concentração ótima de antígeno para o estímulo de linfócitos T *in vitro*. Os esplenócitos de camundongos imunizados por via intraperitoneal não proliferaram de forma significativa quando comparados aos esplenócitos de camundongos normais, enquanto que as células de linfonodo de camundongos imunizados subcutaneamente mostraram índices de estimulação cerca de dezessete vezes maior do que as culturas controle (células de linfonodo de camundongos não imunizados). Os resultados são apresentados na Figura 22. Os esplenócitos dos animais imunizados, apesar de não proliferarem ou proliferarem muito pouco quando estimulados com antígeno, responderam ao estímulo de Con A (Figura 23), demonstrando serem capazes de proliferarem *in vitro*. Devido a esses resultados, escolheu-se o uso da imunização subcutânea para a obtenção de linfócitos T específicos para *Cryptosporidium* dos linfonodos dos animais imunizados.



**FIGURA 22** - Resposta linfoproliferativa a antígenos de *Cryptosporidium* por células de baço ou linfonodo de camundongos imunizados por via intraperitoneal ou subcutânea, respectivamente, com oocistos sonicados, ou de camundongos controle não imunizados. Os valores mostrados nas ordenadas correspondem à razão entre a média aritmética das cpm das culturas estimuladas com antígeno e a média aritmética das cpm das culturas não estimuladas (índice de estimulação) em triplicatas. A variação das triplicatas não excedeu a 9% da média.

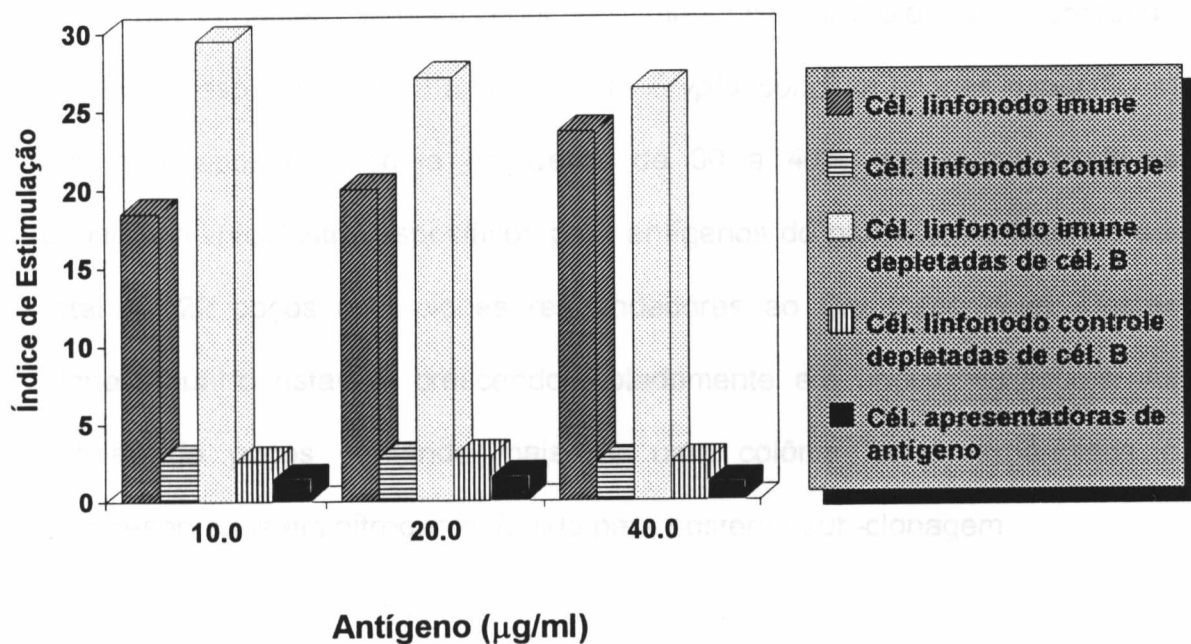




**FIGURA 23** - Resposta linfoproliferativa ao mitógeno concanavalina A (Con A) por células de baço ou de linfonodo de camundongos imunizados por via intraperitoneal ou subcutânea, respectivamente, com antígenos de *Cryptosporidium*, ou de camundongos controle não imunizados. Os valores mostrados nas ordenadas correspondem à razão entre a média aritmética das cpm das culturas estimuladas com mitógeno e a média aritmética das cpm das culturas não estimuladas (índice de estimulação) em triplicatas. A variação das triplicatas não excedeu a 9% da média.

Novos experimentos foram realizados usando células de linfonodo totais, e células de linfonodo depletadas de linfócitos B, estimuladas com concentrações crescentes de antígeno (10, 20 e 40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Os índices de estimulação de células de linfonodos totais de animais imunizados, embora inferiores aos atingidos no experimento anterior, mostraram aumentos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ; teste de análise de variância, ANOVA) proporcionais às quantidades de antígeno adicionadas (Figura 24). Quando as células de linfonodo foram depletadas de linfócitos B, ocorreu o fenômeno inverso. A menor concentração de antígeno utilizada (10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) levou a maior proliferação celular que as outras concentrações, se bem que as diferenças não foram marcantes, apresentando significância estatística ( $p < 0,05$ ; teste de análise de variância, ANOVA) na redução da resposta somente quando elevou-se quatro vezes a quantidade de antígeno (Figura 24). As diferenças entre as respostas proliferativas de células totais de linfonodo e células de linfonodo depletadas de linfócitos B, provenientes de camundongos imunizados, foram estatisticamente significativas, sendo mais intensas quando se utilizou concentrações menores de antígeno (10 e 20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) de *Cryptosporidium* ( $p < 0,01$ ; teste de análise de variância, ANOVA).

Para se certificar da eficiência do bloqueio da proliferação das CAAG pela mitomicina C, e portanto da falta de influência destas nos resultados da incorporação da timidina das diferentes populações celulares utilizadas no experimento, poços controle contendo apenas CAAG foram avaliados. Não ocorreu proliferação nestes poços (Figura 24).



**FIGURA 24** - Resposta linfoproliferativa a antígenos de *Cryptosporidium* por células de linfonodo totais ou depletadas de células B de camundongos imunizados ou não com oocistos sonicados. Os valores mostrados nas ordenadas correspondem à razão entre a média aritmética das cpm das culturas estimuladas com antígeno e a média aritmética das cpm das culturas não estimuladas (índice de estimulação) em triplicatas. A variação das triplicatas não excedeu a 9% da média.

#### 4.2.2 Obtenção de clones de células T respondedoras a antígenos de *Cryptosporidium*

Quando linfócitos de linfonodo de animais imunizados, depletados de linfócitos B, foram incubados por 14-20 dias na presença de antígeno, CAAg e TCGF, poços positivos (contendo linfoblastos) foram identificados ao exame por microscopia de fase invertida. O número de colônias de blastos variou de uma por poço (em poços onde foram adicionadas apenas 0,3 e 3 linfócitos) até no máximo oito por poço (em poços onde foram adicionados 30 ou 300 linfócitos). O número de poços com crescimento celular e o de poços contendo células T respondedoras a antígenos de *Cryptosporidium* (clones específicos) são mostrados na Tabela IV. Cerca de 30 a 40% dos poços positivos continham linfoblastos específicos para antígenos do parasito, perfazendo um total de 22 poços com clones respondedores ao *Cryptosporidium*. Destes clones, quatro estavam crescendo isoladamente em poços individuais. As células de poços contendo mais de uma colônia foram expandidos e criopreservados em nitrogênio líquido para posterior sub-clonagem.

**TABELA IV - Estabelecimento de clones de linfócitos T específicos para antígenos de *Cryptosporidium* através de diluição limitante**

nº de células T / poço <sup>a</sup>	nº de poços examinados	nº de poços positivos <sup>b</sup>	nº de poços com clones específicos <sup>c</sup>
300	96	35	13
30	96	12	5
3	96	7	3
0,3	96	3	1

<sup>a</sup>Células de linfonodo de camundongos imunizados por via subcutânea com 40µg de antígeno de *Cryptosporidium*, foram depletadas de células B e cultivadas em RPMI contendo 0,5% de soro normal de camundongo, na presença de células apresentadoras de antígeno (CAAg) e antígenos de *Cryptosporidium*. Após 8 dias, as células foram purificadas e recultivadas em RPMI contendo 10% de soro bovino fetal por mais 8 dias. As células foram então adicionadas a placas de 96 poços nas concentrações citadas acima, na presença de CAAg, uma fonte de IL-2 e antígenos de *Cryptosporidium*, e cultivadas por 14-20 dias. Poços positivos foram selecionados utilizando microscópio invertido.

<sup>b</sup>Número de poços em que foi observado crescimento de células.

<sup>c</sup>Número de poços em que as células só cresceram na presença de antígeno de *Cryptosporidium*.

## 5. DISCUSSÃO

Uma das finalidades deste trabalho foi a de se implantar no laboratório um modelo experimental murino para a criptosporidiose utilizando animais adultos, imunossuprimidos ou não, a fim de esclarecer alguns aspectos da dinâmica da infecção, tais como a intensidade de colonização e de eliminação de parasitos, e os sinais da doença. Além disso, objetivando utilizar o modelo na avaliação futura do papel protetor de células T através da transferência passiva de imunidade utilizando clones de linfócitos T específicos para *Cryptosporidium*.

Estudos anteriores demonstraram que roedores neonatos (camundongos, ratos, cobaios e hamsters) desenvolvem infecções intestinais intensas após inoculação com  $10^3$  oocistos ou mais (Current e cols., 1983; Current, 1986; Current e Reese, 1986). Todavia, animais imunocompetentes com mais de quatro semanas de idade são difíceis de serem infectados, com encontro de raros parasitos, ou até a ausência destes na mucosa intestinal, após inoculação com oocistos (Reese e cols., 1982; Sherwood e cols., 1982). Vários estudos foram realizados tentando esclarecer a diferença de susceptibilidade entre o camundongo adulto e o camundongo neonato, como por exemplo, procurando atribuí-la a diferenças no sistema imune ou na fisiologia e microflora intestinal (Harp e cols., 1988; Sherwood e cols., 1982; Heine e cols., 1984; Klesius e cols., 1986). Evidências sugerem que os mecanismos de resistência a primo-infecção ao *C. parvum*, e os de recuperação de infecções já estabelecidas, são diferentes (Current e Bick, 1989). A recuperação do camundongo adulto parece requerer imunidade

mediada por linfócitos T (Heine e cols., 1984; Ungar e cols., 1990a), enquanto a resistência inata pode ser dependente de fatores fisiológicos, como por exemplo o tipo de microflora intestinal. Além disso, camundongos adultos “germfree” são mais susceptíveis à infecção por *C. parvum* que os camundongos adultos normais, sugerindo que a microflora intestinal pode estar envolvida na resistência a este parasito (Harp e cols., 1988). O estado imaturo do intestino dos camundongos neonatos pode render os animais susceptíveis à infecção, independentemente de fatores imunológicos.

Apesar da falta de conhecimento preciso das causas de susceptibilidade do camundongo neonato ao *Cryptosporidium*, a infecção deste camundongo constitui-se no modelo animal mais utilizado em pesquisas sobre o *C. parvum* (Arrowood e cols., 1989; Ernest e cols., 1986; Moon e cols. 1988; Sherwood e cols., 1982). Infelizmente, o tamanho extremamente pequeno, o difícil manuseio e o curto período de infecção (duas a três semanas) constituem desvantagens deste modelo. A ocorrência de infecções graves em indivíduos com imunodeficiências, como por exemplo pacientes com AIDS, torna necessário o desenvolvimento de modelos animais adultos para a criptosporidiose crônica que mais se assemelhe ao quadro visto nestes pacientes.

Os hormônios glucocorticóides são anti-inflamatórios potentes e agentes imunossupressores, sendo bastante utilizados na modulação de reações de rejeição de transplantes. Alguns dos mecanismos responsáveis pela ação imunossupressora da dexametasona incluem: a) inibição do RNA mensageiro para IFN- $\gamma$  e TCGF (Arya e cols., 1984); b) diminuição da transcrição de genes Ia (Fertsch-Ruggio e cols., 1988); c) redução da

expressão de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I (Doeberitz e cols., 1990); d) inibição da produção de IL-2 a nível transcricional (Vacca e cols., 1990); e e) redução do número de mastócitos intestinais (Novak e cols., 1990).

A ciclofosfamida e os corticosteróides são as drogas mais associadas com o desenvolvimento da criptosporidiose em pacientes iatrogenicamente imunossuprimidos (Miller e cols., 1983; Mead e cols., 1986; Holley e Thiers, 1986). Devido a alta toxicidade da ciclofosfamida para os roedores (Anton, 1987), a dexametasona tem sido utilizada na imunossupressão de ratos para estudos da criptosporidiose crônica e efeito de drogas terapêuticas (Regh e cols., 1988; Regh, 1991; Rasmussen e cols., 1991). Um desses estudos mostrou que ocorre redução *in vitro* da resposta blastogênica a mitógenos pelas células T (Con A) e B (LPS), da atividade citolítica das células NK e da produção de anticorpos IgG nos animais tratados com dexametasona (Rasmussen e cols., 1991).

A tentativa inicial de se estabelecer um modelo murino de criptosporidiose crônica utilizando camundongos BALB/c tratados com dexametasona por via oral ou intraperitoneal não produziu os resultados desejados. Somente alguns animais que receberam a droga por via intraperitoneal desenvolveram infecção, embora com excreção fugaz e de raros parasitos, após a inoculação com oocistos de *C. parvum*. Como demonstrado previamente (Rasmussen e Healey, 1992), camundongos C57BL/6 tratados com o glucocorticóide são mais susceptíveis ao *C. parvum*. Assim, camundongos desta linhagem foram tratados por via oral ou intraperitoneal com dexametasona, sendo as dosagens escolhidas de acordo



com trabalhos anteriores utilizando ratos (Regh e cols., 1988; Rasmussen e cols., 1991). Apesar de terem sido utilizadas duas linhagens de camundongos previamente testadas (Rasmussen e Healey, 1992), a dosagem oral diária de dexametasona foi administrada de uma única vez, através de agulha de gavagem, na tentativa de evitar variações nos resultados quando a droga é administrada *ad libitum*. Além disso, os modelos foram avaliados através de um acompanhamento mais sistemático, determinando-se a excreção de oocistos a cada dois dias e até a morte dos animais ou resolução completa da infecção. Este acompanhamento permitiu uma melhor análise da variação do número de oocistos excretados e da duração da infecção em camundongos tratados com dexametasona, dados relevantes para testes com drogas terapêuticas na criptosporidiose.

As dosagens orais, já testadas em ratos, tornaram os camundongos susceptíveis à infecção. No entanto, o quadro infeccioso foi breve, assintomático, com eliminação de raros parasitos nas fezes e colonização tecidual limitada ao íleo. O tratamento intraperitoneal com dexametasona, entretanto, levou ao estabelecimento de criptosporidiose crônica, com colonização de toda a mucosa intestinal e excreção de oocistos até a morte dos animais. As vantagens deste modelo incluem o baixo custo quando comparado com outros modelos de imunossupressão ou animais geneticamente imunodeficientes, e o fato de utilizar camundongos adultos. Este modelo entretanto, limita-se a camundongos C57BL/6, não podendo ser utilizado com outros camundongos imunossuprimidos com dexametasona, como testado anteriormente com BALB/c (Rasmussen e Healey, 1992; esta tese), DBA/2, CBA e C3H/HeN (Rasmussen e Healey, 1992).

A avaliação da resposta de anticorpo ao *Cryptosporidium* em camundongos C57BL/6 e BALB/c normais imunizados com antígenos do parasito (esta tese), demonstrou níveis significativamente menores nos primeiros, o que pode sugerir que em camundongos com a resposta imune comprometida pela presença de glucocorticóides em altas concentrações, uma resposta humoral favoreça o controle da infecção.

As dosagens orais de dexametasona foram utilizadas por serem menos traumáticas, além de se evitar possíveis contaminações no local de injeção. Entretanto, apenas a administração por via intraperitoneal produziu um quadro crônico de criptosporidiose após a inoculação com oocistos vivos. As diferenças observadas devem-se provavelmente à administração de doses intraperitoneais do imunossupressor cerca de 25 vezes maiores que as orais, uma vez que doses superiores destas últimas não podem ser utilizadas devido ao efeito tóxico que exercem sobre a mucosa gastrointestinal, levando a índices elevados de mortalidade (Regh e cols., 1988; Rasmussen e Healey, 1992).

Um achado interessante é que embora tenha-se demonstrado a resistência do camundongo adulto normal ao *C. parvum* em vários trabalhos (Reese e cols., 1982; Sherwood e cols., 1982), inclusive os da raça C57BL/6 (Enriquez e Sterling, 1991), os animais do grupo controle (camundongos recebendo salina via oral ou intraperitoneal) apresentaram oocistos nas fezes, apesar de raros, por aproximadamente duas semanas. É possível que o estresse causado pela manipulação diária dos animais tenha desempenhado um papel no desenvolvimento dessa infecção. Esses dados confirmam àqueles encontrados por Rasmussen e cols. (1992), que demonstraram eliminação de

raros parasitos nas fezes de animais controle recebendo salina por via intraperitoneal, porém não no grupo controle recebendo água *ad libitum* livre de dexametasona.

Camundongos com imunodeficiência combinada grave (camundongos SCID) não possuem células T ou B funcionais, porém apresentam números normais de eritrócitos e mielócitos, e população de células NK normal ou aumentada (Bosma, 1989). Estes camundongos, embora tenham desenvolvido criptosporidiose crônica, tiveram o padrão de infecção bastante diferente do apresentado pelos camundongos imunossuprimidos com glucocorticóide. A eliminação de oocistos ocorreu tardiamente, aproximadamente na quarta semana após inoculação, intensificando-se gradativamente até o final do experimento. A colonização tecidual foi observada principalmente no íleo e em alguns animais também no duodeno, jejuno, ceco e cólon. O envolvimento da vesícula biliar e dos ductos biliares foi observado em camundongos SCID infectados no período neonatal (Mead e cols., 1991). Entretanto, conforme observado no presente trabalho, a distribuição do parasito restringiu-se ao trato intestinal em animais adultos.

O desenvolvimento rápido de sintomatologia com sobrevida de no máximo 90 dias, e os números mais elevados de oocistos nas fezes em animais tratados com dexametasona em relação aos camundongos SCID (por exemplo, média de 11 e de aproximadamente 0,1 oocistos por campo no 40<sup>o</sup> dia pós-infecção, respectivamente), além do início precoce da eliminação de números significativos de oocistos nas fezes e da disseminação da infecção por todo o trato intestinal, indicam que o tratamento com o glucocorticóide tem um efeito mais amplo na depressão da resposta imune anti-*Cryptosporidium* do

que o defeito SCID. As infecções em camundongos SCID desenvolveram-se lentamente, sugerindo uma resistência inicial não-específica, com a multiplicação do parasito superando a barreira inicial de defesa. Esta resistência inicial dos camundongos SCID poderia ser devida à produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pelas células NK intestinais. De fato, de acordo com McDonald e Bancroft (1994), a administração semanal de anticorpos anti-IFN- $\gamma$  em camundongos SCID infectados com *C. parvum*, resultou no aumento de excreção de oocistos e na redução do período de estabelecimento da sintomatologia e morte. Estudos realizados por Ungar e cols. (1991) mostraram que a neutralização *in vivo* de IFN- $\gamma$  leva a um aumento da multiplicação de *C. parvum* em camundongos imunocompetentes. Entretanto, resultados similares foram obtidos em camundongos atímicos, sugerindo que outro(s) tipos celular(es), além do linfócito T, produzem esta citocina em resposta ao parasito (Ungar e cols., 1991).

Os mecanismos efetores do IFN- $\gamma$  não estão bem definidos, mas podem incluir ativação de macrófagos (Schreiber e cols., 1985), inibição da invasão da célula hospedeira ou diminuição dos nutrientes intracelulares para o parasito através do aumento do catabolismo do triptófano (Kogut e Lange, 1989; Pfefferkorn, 1984). A inibição da produção de IFN- $\gamma$  pode explicar parte da ação imunossupressora de dexametasona (Aryas e cols., 1984). Um estudo sobre os efeitos da droga em ratos infectados com *C. parvum*, mostrou que esta suprime a atividade de células NK, conseqüentemente, também a produção de IFN- $\gamma$  pelas mesmas (Rasmussen e cols., 1991).

Novak e cols. (1990) demonstraram que dexametasona reduz o número de mastócitos duodenais em camundongos, promovendo o crescimento de

*Hymenolepis microstoma* nos animais infectados. O papel protetor de mastócitos na criptosporidiose murina foi investigada por Harp e Moon (1991). Os camundongos adultos com deficiência dessas células foram mais susceptíveis à infecção que os camundongos normais.

As ações supressoras mais abrangentes da dexametasona em relação à deficiência de células T e B apresentada pelos SCID, principalmente no que se refere à inibição da atividade citotóxica de células NK e da produção de IFN- $\gamma$ , podem ser os responsáveis pelas diferenças observadas entre as infecções por *C. parvum* nos dois modelos avaliados. Corroboram com esta hipótese os resultados dos experimentos realizados por Mead e cols. (1991), que demonstraram que camundongos NIH-III *nu/nu* (além de serem atímicos, são deficientes de células B e NK) desenvolvem infecções por *C. parvum* mais graves que os SCID, envolvendo o fígado e ductos biliares.

Os sinais clínicos observados tanto no modelo com camundongos C57BL/6-corticóide quanto no SCID (desidratação, icterícia, perda de peso) são similares àqueles vistos em pacientes com AIDS. Indivíduos com esta síndrome e criptosporidiose experimentam sintomas variáveis, com períodos assintomáticos alternados com diarreia moderada a grave (Fayer e Ungar, 1986; Crawford e Vermund, 1988). Localizações extraintestinais associadas à sintomatologia (colecistite, colangite, hepatite portal e pancreatite), principalmente envolvendo o trato biliar foram descritas (Gross e cols., 1986; Hawkins e cols., 1987; Kahn e cols., 1987).

O número de oocistos vistos nas fezes da maioria dos seres humanos infectados por *Cryptosporidium* varia bastante (Stehr-Green e cols., 1987), assim como nos modelos aqui descritos. O conhecimento da variabilidade do

número de oocistos excretados é bastante útil na análise dos efeitos de drogas e imunoterápicos em seres humanos. A diminuição ou mesmo ausência de parasitos no exame de fezes, em casos isolados, não significa necessariamente eficácia do tratamento. Os animais imunodeficientes ou imunossuprimidos, utilizados como modelos neste trabalho, mostraram essa variabilidade durante todo o experimento.

Embora ambos os modelos prestem-se bem ao desenvolvimento de criptosporidiose crônica e o trabalho utilizando camundongos SCID seja menos laborioso, a realização de testes com drogas terapêuticas podem ser realizados mais rapidamente e analisados mais facilmente no modelo C57BL/6-dexametasona, uma vez que a infecção se estabelece precocemente e de maneira mais intensa nestes últimos. Uma outra vantagem deste modelo é o menor custo na aquisição e manutenção dos animais.

Os primeiros casos de criptosporidiose crônica relatados em pacientes com deficiência de imunoglobulinas (Lasser e cols., 1979; Sloper e cols., 1982) sugerem a participação de anticorpos na resolução natural da doença. Além disso, a produção de anticorpos anti-*Cryptosporidium* é observada durante o curso da infecção autolimitada no homem e animais imunocompetentes (Casemore, 1987; Campbell e Current, 1983; Ungar e cols., 1986). Alguns estudos demonstraram que a incidência de criptosporidiose é menor em crianças que receberam amamentação materna (Hojlyng e cols., 1986; Mata e cols., 1984), sugerindo que fatores imunes no leite podem ajudar no controle da infecção por *C. parvum*. Similarmente, o colostro de vacas imunizadas com antígenos de oocistos ou esporozoítos protegem parcialmente tanto animais (Arrowood e cols., 1989; Fayer e cols., 1990; Perryman e cols., 1990; Watzl e

cols., 1993) quanto pacientes com AIDS (Nord e cols., 1990; Ungar e cols., 1990).

No presente trabalho foi investigada a susceptibilidade à criptosporidiose em um modelo murino utilizando camundongos bons e maus produtores de anticorpos. As seleções foram desenvolvidas em estudos sobre a regulação poligênica da resposta humoral quantitativa, que difere da regulação pelos genes Ir (specific immune response genes), que é essencialmente qualitativa e específica. Os camundongos são selecionados usando como caráter fenotípico o título de aglutininas após imunização com doses ótimas de antígenos específicos. As linhagens boas (H) e más (L) produtoras de anticorpos divergem progressivamente até a separação máxima interlinhagem, onde cada linhagem é homozigótica para os genes que controlam o caráter investigado. A separação progressiva entre linhagens demonstra que o caráter investigado está submetido realmente a uma regulação poligênica (Stiffel e cols., 1987). A regulação genética opera na síntese de todas as classes de imunoglobulinas e subclasses de IgG e o efeito deste grupo de genes é essencialmente não específico, uma vez que opera igualmente na resposta de anticorpo a muitos imunógenos multideterminantes, T-dependentes ou T-independentes. O cruzamento seletivo dos camundongos produz modificações em outros parâmetros imunológicos, sendo o principal deles a função macrofágica. A atividade fagocítica dos macrófagos do baço, fígado e peritônio é idêntica nas linhagens H e L, porém o catabolismo do material ingerido é muito maior nas linhagens L (Adorini e Doria, 1981). A persistência do antígeno na forma imunogênica nos macrófagos dos camundongos bons produtores de anticorpos é um dos principais fatores da

diferença de resposta de anticorpo interlinhagem (Biozzi e cols., 1984; Mouton e cols., 1984). Outra característica marcante é que a imunidade celular mediada por linfócitos T tem a mesma intensidade nas duas linhagens (Couderc e cols., 1990; Reis e cols., 1992). De maneira geral, as linhagens L são mais resistentes que as linhagens H contra infecções por microorganismos intracelulares tais como: *Salmonellae*, *Yersinia*, *Mycobacteria*, *Brucellae* e *Leishmania* (Biozzi e cols., 1978; Massa, 1990), onde o macrófago constitui a principal barreira de defesa. Inversamente, as linhagens H são mais resistentes que a L contra microorganismos com pelo menos parte do seu ciclo de vida extracelular, os quais são eficientemente combatidos por uma alta resposta de anticorpo tais como *Pneumococcus*, *Klebsiella*, *Plasmodia* e *Trypanosoma* (Biozzi e cols., 1978; Massa, 1990). Assim, os camundongos H e L constituem um modelo útil para estudos da importância relativa da resposta humoral, imunidade celular e atividade de macrófago na defesa natural contra infecções e no efeito protetor de vacinações.

Apesar dos dados relatados acima indicando a importância da resposta humoral no controle da criptosporidiose (por exemplo o relato de paciente com hipogamaglobulinemia e função de linfócitos T normal apresentando quadro de diarreia grave devido ao *Cryptosporidium*), os resultados do presente estudo mostraram que as linhagens boas ou más produtoras de anticorpos são igualmente resistentes ao parasito.

Para a tentativa de infecção dos camundongos H e L, escolheu-se um inóculo utilizado na maioria dos modelos animais adultos apresentando algum tipo de alteração no sistema imune, uma vez que a seleção bidirecional levou a modificações de parâmetros imunobiológicos tornando os animais mais



susceptíveis ou mais resistentes a determinadas infecções. A localização intracelular do *Cryptosporidium* poderia implicar em uma resistência maior das linhagens L devido à presença de macrófagos hiperativados. Embora tenha-se demonstrado a presença do parasito em macrófagos intestinais junto às placas de Peyer (Marcial e Madara, 1986), não foi estabelecido um papel de defesa para estas células. Por outro lado, a posição citoplasmática periférica do *Cryptosporidium* poderia torná-lo acessível a ação de anticorpos secretórios, principalmente IgA, nos camundongos das linhagens H, tornando-os resistentes a infecção. Embora tenha-se demonstrado uma soroconversão específica que acompanha a recuperação da criptosporidiose (Campbel e Current, 1983), nenhum trabalho foi realizado para se investigar o papel da resposta imune a nível intestinal na criptosporidiose.

Apesar de estudos utilizando colostro imune (Arrowood e cols., 1989; Fayer e cols., 1989), e de um relato de criptosporidiose prolongada em indivíduo com imunodeficiência de IgA (Jacyna e cols., 1990), sugerirem um papel protetor para este isotipo, esta imunoglobulina não foi avaliada no presente estudo. No entanto, trabalhos anteriores mostram claramente que a resposta de anticorpo nos camundongos H e L não é isotipo-restrita, assim supõe-se que os camundongos que não produziram IgG ou IgM em resposta ao *C. parvum*, também não produziram IgA sérica ou secretória.

O não estabelecimento da infecção nos animais das linhagens H e L demonstra que a atividade catabólica de macrófagos lenta ou a baixa produção de anticorpos não são deficiências imunológicas substanciais para tornarem os camundongos susceptíveis à infecção. Por outro lado, é possível que tanto a alta produção de anticorpos pelos linfócitos B nas linhagens H, ou

a hiperatividade de macrófagos nas linhagens L, são suficientes em conferir resistência ao *C. parvum*.

A produção de anticorpos, particularmente de classe IgG, tanto nas linhagens H quanto L, em resposta à inoculação de oocistos vivos, foi baixa ou inexistente, apesar de camundongos de algumas linhagens apresentarem níveis elevados de anticorpo antes da inoculação, o que poderia ser explicado por exposição prévia ao parasito ou por reação cruzada deste com outros antígenos com os quais os camundongos tenham entrado em contato. Esta resposta deficiente de anticorpos poderia ser devida à inadequação da forma de apresentação dos antígenos, isto é, os oocistos inoculados por via oral não estimulariam bem a resposta imune humoral sistêmica, acarretando apenas uma discreta resposta de anticorpos IgM (Figuras 19-21), talvez por não se estabelecerem bem como infecção. Uma outra possibilidade seria a de que antígenos de *Cryptosporidium* seriam por si mesmos pouco imunogênicos para as linhagens estudadas. Esta última possibilidade foi investigada através da imunização de camundongos destas linhagens pela inoculação intraperitoneal de antígenos de *Cryptosporidium* associado ao hidróxido de alumínio.

As nítidas respostas de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* nos camundongos das linhagens H<sub>GS</sub> e H<sub>GP</sub> imunizados (níveis cerca de 4 a 5 vezes acima dos níveis pré-imunização em termos de densidades ópticas no ELISA; Figuras 9 e 10) indicam que os antígenos de *Cryptosporidium* são relativamente imunogênicos para essas linhagens. A resposta de anticorpos IgG, no entanto, foi pouco expressiva nos camundongos da linhagem H<sub>IVa</sub> (Figura 8), provavelmente por estes apresentarem níveis já elevados desde o início, o que pode ser indicativo de provável ativação prévia de um mecanismo

de controle desta resposta. Além disso, os resultados obtidos com a imunização das linhagens boas e más respondedoras com os antígenos de *Cryptosporidium* demonstram que essas linhagens comportam-se, para a produção de anticorpos IgG, da forma descrita na literatura em relação a outros antígenos (Biozzi e cols, 1979), isto é, os camundongos bons respondedores produzindo significativamente ( $p < 0,05$ ; método não paramétrico de Wilcoxon) mais anticorpos que os camundongos maus-respondedores. Na verdade foi observada produção discreta de IgG anti-*Cryptosporidium* apenas em uma linhagem má respondedora, a L<sub>IVa</sub> (Figura 8). Resultados consistentes com as características das linhagens foram também observados em relação à resposta de IgM em camundongos da seleção GP (Figura 14). No entanto não houve diferenças estatisticamente significantes entre as respostas de IgM nos camundongos bons e maus respondedores das seleções IVa e GS (Figuras 19 e 20), em desacordo com os relatos acima referidos. A falta de resposta IgM nos camundongos da linhagem H<sub>IVa</sub>, no entanto, pode ser devida ao fato destes camundongos apresentarem níveis elevados de IgM antes da imunização, podendo a produção de IgM anti-*Cryptosporidium* já estar previamente submetida à ação de mecanismos de controle da resposta imune, conforme discutido acima para a resposta de IgG na linhagem H<sub>IVa</sub>.

Através da análise da resposta específica de anticorpo, após imunização com antígenos do parasito nos camundongos híbridos F<sub>1GP</sub>, foi observada uma dominância parcial da má resposta (Figuras 10 e 14, Tabela III). Isto contrasta com o que é observado em relação a outros imunógenos, tais como eritrócitos heterólogos e antígenos virais ou bacterianos, nos quais a boa resposta é dominante. Conforme discutido acima, boa e a má resposta

estão submetidas a regulação poligênica, e, provavelmente, alguns genes determinam a expressão de características que suprimem a resposta imune humoral, e outros genes determinam a expressão de características que estimulam esta resposta. Os camundongos F<sub>1</sub>, obviamente, herdam os dois tipos de genes. Os antígenos de *Cryptosporidium* parecem, desta forma, estimular mais mecanismos que suprimem do que os que estimulam a resposta imune humoral, quando comparados a outros antígenos. Se isto corresponde a um mecanismo de escape e se é importante em termos de facilitar a infecção pelo *Cryptosporidium*, é algo aberto a investigações futuras.

Por outro lado, a resposta de anticorpos IgG e IgM anti-*Cryptosporidium* por camundongos BALB/c foi significativamente ( $p < 0,05$ ; teste não-paramétrico de Wilcoxon) mais elevada que a observada em camundongos C57BL/6. Estes resultados sugerem um papel protetor da resposta humoral, como observado no desenvolvimento de modelos experimentais imunossuprimidos com corticóide, onde os camundongos BALB/c foram resistentes à infecção pelo *C. parvum*, contrastando com desenvolvimento de infecção crônica nos camundongos C57BL/6.

Apesar dos resultados das linhagens geneticamente selecionadas para a resposta H e L mostrarem graus de resistência ao *C. parvum* semelhantes, como descrito acima, as heranças genéticas dos camundongos utilizados como modelos experimentais devem influenciar na susceptibilidade e no padrão de infecção desenvolvido. Por exemplo, os camundongos C57BL/6 adultos são mais susceptíveis à infecção por *C. parvum* do que os BALB/c, podendo ser infectados mesmo na ausência de um regime imunossupressor, embora não desenvolvam criptosporidiose crônica (Rasmussen e cols., 1992a;

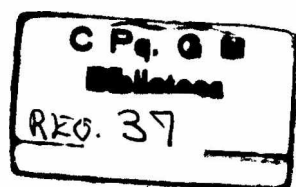
esta tese). Outra observação importante é que os camundongos SCID, que são uma linhagem mutante derivada de BALB/c C.B-17, desenvolvem infecção por *C. parvum* mais lenta e menos intensa do que os camundongos C57BL/6 tratados com dexametasona, sugerindo que no processo de derivação dessa linhagem, gen, ou genes, que estimulam mecanismos de defesa contra o *C. parvum* foram preservados. Os camundongos H e L são, por sua vez, selecionados a partir de uma população heterogênea de camundongos suíços. Apesar da seleção bidirecional para a produção de anticorpos modificar também a atividade de macrófagos, as linhagens H e L são igualmente refratárias à infecção pelo *C. parvum*, mantendo-se portanto, a resistência natural da população inicial. É provável que a seleção de camundongos singeneicos, como por exemplo os C57BL/6, em linhagens boas e más produtoras de anticorpos, produzisse animais com diferentes padrões de susceptibilidade ao *C. parvum*.

As evidências para um papel protetor de linfócitos T na criptosporidiose consistem em vários relatos de diarreia grave e prolongada em pacientes com AIDS, enquanto que indivíduos com linfócitos T funcionais curam-se da infecção em duas semanas (Tzipori, 1983; Current e cols., 1983; Fayer e Ungar, 1986). A importância dos linfócitos T na resolução da doença foi demonstrada também em diversos trabalhos experimentais. Heine e cols. (1984a) relataram o desenvolvimento de infecção crônica com diarreia, perda de peso e desidratação em camundongos atímicos. Ungar e cols. (1990a) demonstraram papel protetor de células CD4<sup>+</sup> na criptosporidiose através da depleção desta subpopulação de linfócitos em camundongos BALB/c. Os camundongos neonatos normais infectados curam-se em aproximadamente

três semanas, enquanto que aqueles recebendo anticorpos anti-CD4, desenvolvem criptosporidiose crônica semelhante a camundongos atímicos. O tratamento com anticorpos anti-CD8, apenas, não produziu os mesmos resultados (Ungar e cols, 1990a).

Todas as células T em uma população monoclonal expressam, obviamente, receptores para antígeno (TCR) idênticos. Isso proporciona uma população celular homogênea para análises funcionais, bioquímicas e moleculares. O desenvolvimento de técnicas para ativação e propagação de populações monoclonais de linfócitos T *in vitro* tem sido crucial para o avanço no entendimento dos processos de reconhecimento de antígeno e ativação desses linfócitos (Glasebrook e cols., 1984). Clones de linfócitos T antígeno-específicos são obtidos através de imunização *in vivo* com determinado antígeno, isolamento de linfócitos T do tecido linfóide, estímulo repetitivo *in vitro* com o antígeno específico na presença de células apresentadoras de antígeno histocompatíveis e clonagem em meio semi-sólido ou em meio líquido por diluição limitante. Neste trabalho foi desenvolvida uma linhagem de linfócitos T responsiva a antígenos de *C. parvum* a partir de células de linfonodo de camundongos BALB/c sensibilizadas *in vivo*, objetivando-se a clonagem e análise posterior das subpopulações de linfócitos envolvidas, antígenos reconhecidos pelas mesmas e estudos de transferência passiva de imunidade em modelos animais imunossuprimidos.

Em experimentos preliminares, procurou-se estabelecer o melhor método de imunização para obtenção da linhagem T específica para o parasito. A inoculação subcutânea de antígenos de *Cryptosporidium* ocasionou uma resposta melhor a nível de linfonodos do que a inoculação intraperitoneal



ocasionou a nível do baço. A baixa efetividade da imunização intraperitoneal observada no presente trabalho é consistente com os resultados de um estudo anterior sobre resposta blastogênica após injeção intraperitoneal de oocistos intactos em camundongos BALB/c (Whitmire e Harp, 1990), demonstrando que a imunização intraperitoneal utilizando oocistos inteiros ou sonicados não se presta como método de sensibilização de células esplênicas ao *C. parvum*. Além disso, células de baço submetidas a ensaios blastogênicos após imunização subcutânea com antígeno, também não responderam bem ao estímulo antigênico *in vitro* (dados não mostrados). Células de linfonodo de animais imunizados por via subcutânea, entretanto, proliferaram até 17 vezes mais que as células de camundongos controle (não imunizados) quando estimulados com antígenos do parasito, demonstrando a eficiência da imunização subcutânea para obtenção das células T responsivas ao *C. parvum*.

Estabelecido o modelo de imunização e o tecido linfóide a ser coletado, células totais de linfonodo de camundongos imunizados foram novamente submetidas a ensaios blastogênicos. Os resultados destes ensaios mostraram que a concentração de  $40 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de antígeno de *C. parvum* produziu uma resposta discretamente maior do que concentrações de 10 e  $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de antígeno. No entanto, quando se utilizou células de linfonodo depletadas de linfócitos B, a resposta foi melhor com a concentração de  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de antígeno de *C. parvum*. Foi escolhida então esta concentração para o desenvolvimento da linhagem de linfócitos T específicos.

Os estudos proliferativos em camundongos expostos ao *C. parvum* são ainda muito limitados, com resultados variáveis de acordo com a via de

imunização, idade dos animais utilizados e o tipo de antígeno empregado. Whitmire e Harp (1990) demonstraram que esplenócitos, mas não linfócitos de linfonodos mesentéricos, de camundongos imunizados via oral semanalmente, durante 6-10 semanas, eram capazes de proliferar *in vitro* na presença de antígenos de oocistos. Entretanto, a transferência passiva destas células ou de sobrenadante de cultura não conferiram proteção aos camundongos receptores (Harp e Whitmire, 1991). Em outro estudo, a resposta linfoproliferativa de linfócitos de baço e de linfonodo a antígenos de *C. parvum* solúveis e insolúveis em água, foi estudada em tempos diferentes após inoculação intragástrica de camundongos neonatos com oocistos vivos. Apenas linfócitos de linfonodo proliferaram em resposta a estes antígenos (Moss e Lammie, 1993).

Os resultados de pesquisas sobre as subpopulações de linfócitos T ativados por antígenos de *C. parvum* também são contraditórios. Sabe-se que camundongos atímicos, ou tratados com anti-CD4 ou com anti-CD4 e anti-CD8, desenvolvem infecções crônicas quando inoculados com *C. parvum* (Ungar e cols., 1990; Ungar e cols., 1991), porém a administração isolada de anti-CD8 não produz os mesmos resultados (Ungar e cols., 1991). Em outro experimento, os bezerros infectados com *C. parvum* apresentaram um aumento do número de linfócitos CD8 esplênicos sugerindo um papel destas células no desenvolvimento e regulação da resposta imune ao parasito (Harp e cols., 1995).

No presente trabalho, após estabelecimento de uma linhagem T respondedora a antígenos de *C. parvum*, foi realizada a clonagem através de diluição limitante. Após obtenção dos clones, estes foram submetidos ao teste



de especificidade para *Cryptosporidium* (crescimento ou não apenas na presença de antígeno). Cerca de 22 poços contendo clones específicos foram identificados, sendo que quatro deles apresentavam clones isolados. Estes clones serão eventualmente caracterizados fenotipicamente, em termos de marcadores de superfície e padrão de linfocinas produzidas, além de quanto à especificidade antigênica (ver adiante), sendo então testados em estudos de proteção passiva em modelos de criptosporidiose em camundongos. O modelo poderá ser tanto o SCID ou o de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com corticóide. Este último modelo tem as vantagens citadas anteriormente (maior susceptibilidade à infecção e custos menores), mas dependerá da suspensão do tratamento com o corticóide e posterior averiguação de possível efeito acelerador do processo de cura pelos clones de células T.

Neste trabalho foi, portanto, demonstrado que linhagens de células T específicas para *Cryptosporidium* podem ser estabelecidas e mantidas em cultura. A clonagem destas linhagens, sua propagação e os experimentos de transferência passiva de imunidade propostos acima, permitirão estudos sobre os mecanismos pelos quais essas células mediam a resolução da infecção, bem como a identificação dos antígenos capazes de promover uma resposta imunoprotetora contra o *C. parvum*.

O desenvolvimento de técnicas para purificação de oocistos de *Cryptosporidium*, e para separação de esporozoítos de oocistos intactos e paredes de oocistos (Current, 1990), permitiu o uso da eletroforese e imunoblot para a identificação de diversas proteínas e glicoproteínas destes estádios do ciclo de vida do parasito. Estes estudos identificaram mais de 50 bandas no perfil eletroforético de esporozoítos, oocistos ou ambos (Tilley e

cols., 1990; Tilley e Upton, 1990; Tilley e cols., 1990a). No presente estudo foi utilizado antígeno total de oocistos purificados para a estimulação dos linfócitos *in vitro*, de maneira a não limitar o desenvolvimento de clones específicos a proteínas de determinados estádios de parasito. A utilização de antígeno não fracionado poderia gerar células respondedoras a diferentes antígenos, inclusive aqueles de reação cruzada entre diferentes estádios (merozoíto e esporozoíto, por exemplo). Entretanto, a purificação de antígenos proporcionará a determinação da especificidade de linhagens ou clones produzidos no presente trabalho. Com esse objetivo iniciamos o fracionamento de proteínas de esporozoítos e de parede de oocistos através de SDS-PAGE. Alternativamente, o método de eletro-eluição será utilizado no futuro para o isolamento destas proteínas.

Objetivando a obtenção de antígenos específicos do parasito, um método de purificação de esporozoítos mais eficaz, utilizando colunas de DEAE-Sepharose, também vem sendo testado para obtenção de um maior número de esporozoítos livres de contaminação por paredes de oocistos ou por oocistos inteiros, em substituição à separação através de gradiente de Percoll (Arrowood e Sterling, 1987).

A identificação de um antígeno capaz de estimular uma resposta imunoprotetora de células T em camundongos infectados por *Cryptosporidium* abre a perspectiva do uso deste antígeno putativo em um esquema imunoterápico de pacientes imunodeficientes. Em relação a este ponto são animadores os resultados recentes do grupo do Dr. S. Coutinho (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro) sobre a cura clínica de leishmaniose

em paciente com AIDS através de imunoterapia com antígenos parasitários (Coutinho e cols, 1996).

## 6. CONCLUSÕES

1. Camundongos C57BL/6 adultos, mas não camundongos BALB/c, tratados com dexametasona por via intraperitoneal tornaram-se altamente susceptíveis a infecção pelo *Cryptosporidium parvum*, desenvolvendo criptosporidiose crônica e eliminando números elevados de oocistos nas fezes, até a morte dos animais. A colonização das vilosidades intestinais foi observada com maior intensidade no íleo, ocorrendo também comprometimento do duodeno, jejuno, ceco e cólon.

2. Camundongos SCID inoculados com oocistos de *C. parvum* desenvolveram infecção menos intensa, com excreção de poucos parasitos nas primeiras seis semanas de infecção, aumentando gradativamente o número de oocistos nas fezes. Além de colonizar as vilosidades intestinais do íleo, foram encontrados parasitos no duodeno, jejuno, ceco e cólon, dependendo do tempo de infecção.

3. Camundongos bons (H) e maus (L) produtores de anticorpos são igualmente resistentes à infecção pelo *C. parvum*. Outros mecanismos de defesa, tais como os decorrentes da atividade macrofágica e/ou da resposta de linfócitos T, devem conferir proteção a estes animais.

4. A resposta imune humoral deficiente dos camundongos H e L inoculados com *Cryptosporidium* vivos não é devida a baixa imunogenicidade intrínseca dos antígenos de *Cryptosporidium* já que anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* foram produzidos em resposta a imunização com antígenos do protozoário nas

linhagens boas-produtoras de anticorpos H<sub>GP</sub> e H<sub>GS</sub>, sendo também observados níveis baixos de IgM. Nenhuma linhagem má-produtora, com exceção da L<sub>IVa</sub>, mostrou produção de anticorpos específica ao *Cryptosporidium*. Uma dominância parcial da má resposta foi apresentada pela seleção GP.

5. A imunização subcutânea de camundongos com antígenos de *C. parvum* induziu uma resposta linfoproliferativa de células de linfonodo estimuladas *in vitro* com antígenos do parasito. A imunização intraperitoneal no entanto, estimulou pouco a resposta de esplenócitos ao *C. parvum*.

6. Células de linfonodo imune, depletadas de linfócitos B, podem ser estimuladas *in vitro* com antígenos de *C. parvum*, gerando clones de linfócitos T respondendo especificamente ao parasito. Esta abre a possibilidade de determinar-se a natureza das subpopulações de linfócitos T envolvidas na proteção através de experimentos de transferência passiva de imunidade, seja a nível do fenótipo, seja a nível da especificidade antigênica desses linfócitos.

## RESUMO

A associação do *Cryptosporidium* com diarreia em crianças e, principalmente, em pacientes com AIDS, tornou a criptosporidiose uma das protozooses emergentes mais estudadas nas duas últimas décadas. A utilização de modelos animais adultos para a criptosporidiose crônica possibilitaria os estudos com drogas terapêuticas e a caracterização dos mecanismos da resposta imune responsáveis pela resolução da infecção.

No presente trabalho foram avaliados modelos murinos adultos para a criptosporidiose, utilizando animais com imunodeficiência natural ou induzida experimentalmente, com os seguintes resultados: a) camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dexametasona por via intraperitoneal desenvolveram criptosporidiose crônica, contrastando com o quadro de infecção breve observado nos camundongos BALB/c tratados da mesma maneira; b) camundongos SCID também desenvolveram infecção crônica, porém de curso lento e com eliminação moderada de oocistos, indicando que a resposta imune anti-*Cryptosporidium* nestes camundongos é mais eficaz do que a de camundongos C57BL/6 tratados com glucocorticóide; c) nenhuma das linhagens de camundongos selecionados para a alta (H) e baixa (L) resposta de anticorpo desenvolveu infecção quando inoculados com oocistos vivos de *C. parvum*, concordando com alguns trabalhos que reportam que a deficiência de anticorpos não é suficiente para o estabelecimento da criptosporidiose em camundongos adultos. A imunização dos camundongos H e L induziu a produção de anticorpos IgG e IgM anti-*C. parvum* nas linhagens H, como esperado. Entretanto, camundongos da geração

F<sub>1</sub> (H x L) apresentaram uma dominância parcial da má resposta, diferindo do descrito para outros antígenos.

Visando futuros estudos sobre o papel de linfócitos T na resolução da infecção por *Cryptosporidium* nos modelos experimentais aqui caracterizados, foram padronizadas as condições necessárias ao desenvolvimento de linhagens de células T específicas ao *C. parvum*. Para tanto, camundongos BALB/c foram imunizados com antígenos do parasito. As células de linfonodo desses animais, depletadas de linfócitos B, foram então cultivadas na presença de antígenos do parasito, células apresentadoras de antígenos e/ou uma fonte de IL-2, obtendo-se uma linhagem de células T específicas ao *C. parvum*. A clonagem desta linhagem por diluição limitante produziu quatro clones reativos ao *C. parvum*. A utilização destes clones em experimentos de transferência passiva de imunidade, e em ensaios proliferativos frente a diferentes proteínas de *C. parvum*, abre possibilidades para a determinação da natureza das subpopulações de linfócitos T envolvidos na proteção, e a caracterização dos antígenos parasitários reconhecidos por estas células. Tanto o modelo de camundongos SCID, quanto o de camundongos C57BL/6 tratados com dexametasona, estudados nesta tese, podem ser utilizados nos experimentos de transferência passiva de imunidade.

## SUMMARY

The association of *C. parvum* with diarrhea in children and in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) has boosted the scientific interest in this coccidian by researchers. A major factor contributing to the importance of studies on cryptosporidial infections is the absence of any efficacious chemotherapeutic agents. Moreover, the understanding of the mechanisms mediating host resistance is still limited. The use of adult animal models of chronic cryptosporidiosis should provide the means to screen drugs and characterize immune responses that result in recovery from infection.

In this work we have evaluated adult animal models of chronic cryptosporidiosis by using experimentally or naturally immunodeficient mice with the following results: a) C57BL/6 mice receiving injections of dexamethasone developed chronic infections, contrasting with BALB/c mice receiving the same drug treatment; b) SCID mice also developed chronic cryptosporidiosis, but the infection was protracted and with moderate oocyst excretion, suggesting that their immune response against *C. parvum* is more efficient than that of dexamethasone-treated C57BL/6 mice; and c) mice selected for high (H) and low (L) antibody production did not develop detectable infections when inoculated with live *C. parvum* oocysts, supporting the view that an antibody deficiency alone is not enough to allow the establishment of the *C. parvum* infection in adult mice. Immunization of both H and L lines with *C. parvum* antigens induced specific IgG and IgM responses as expected. However, the response to immunization of low x high



responder F<sub>1</sub> hybrids disclosed an incomplete dominance of the low character, contrasting with the incomplete dominance of the high response described for many other antigens.

To permit studies on the T cell role in *Cryptosporidium* infection, the conditions for the production of *C. parvum*-specific T cell lines was standardized. With this aim, BALB/c mice were immunized with oocyst antigens. The culture of primed lymph node cells from mice, after depletion of B lymphocytes, with the parasite antigens, the antigen presenting cells and/or a source of IL-2 generated a *C. parvum*-specific T cell line. Four *Cryptosporidium*-reactive clones were obtained from that line by limiting dilution. Adoptive transfer studies using these clones could allow the investigation on the nature of the T cell subsets and the characterization of potential antigens involved in protection against *C. parvum* infection. Either the SCID or the dexamethasone-treated C57BL/6 mice model could be used in these studies.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADORINI, L. & DORIA, G. Defective antigen presentation by macrophage from mice genetically selected for low antibody response. **Eur. J. Immunol.** **11**: 984-989, 1981.
- ALBERT, M.M.; RUSNAK, J.; LUTHER, M.F.; GRAYBILL, J.R. Treatment of murine cryptosporidiosis with anticryptosporidial immune rat bile. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **50(1)**: 112-119, 1994.
- ALPERT, G.; BELL, L.M.; KIRKPATRICK, C.E.; BUDNICK, L.D.; CAMPOS, J.M.; FRIEDMAN, H.M.; PLOTKIN, S.A. Outbreak of cryptosporidiosis in a day-care center. **Pediatrics** **77**: 152-157, 1986.
- ANDERSON, B.C. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. **Am. J. Public. Health** **75**: 1433-1434, 1985.
- ANGUS, K.W. Cryptosporidiosis in man, domestic animals, and birds: a review. **J. R. Soc. Med.** **76**: 62-70, 1983.
- ANGUS, K.W.; HUTCHISON, G.; CAMPBELL, I.; SNODGRASS, D.R. Prophylactic effects of anticoccidial drugs in experimental murine cryptosporidiosis. **Vet. Rec.** **114**: 166-168, 1984.
- ANGUS, K.W.; SHERWOOD, D.; HUTCHISON, G.; CAMPBELL, I. Evaluation of the effect of aldehyde-based disinfectants on the infectivity of faecal cryptosporidia for mice. **Res. Vet. Sci.** **33**: 379-381, 1982.
- ANTON E. Delayed toxicity of cyclophosphamide in normal mice. **Br. J. Exp. Pathol.** **68**: 237-249, 1987.

ARGENZIO, R.A.; LIACOS, J.A.; LEVY, M.L.; MEUTEN, D.L.; LECCE, J.G.; POWELL, D.W. Villous atrophy, crypt hiperplasia, cellular infiltration and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. **Gastroenterology** **98**: 1129-1140, 1990.

ARMITAGE, K.; FLANIGAN, T.; CAREY, J.; FRANK, I.; MACGREGOR, R.R.; ROSS, P.; GOODGAME, R.; TURNER, J. Treatment of cryptosporidiosis with paromomycin. **Arch. Inter. Med.** **152**: 2497-2499, 1992.

ARROWOOD, M.J. & STERLING, C.R. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. **J. Parasitol.** **73(2)**: 314-319, 1987.

ARROWOOD, M.J. & STERLING, C.R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocysts detection. **J. Clin. Microbiol.** **27**: 1490-1495, 1989.

ARROWOOD, M.J.; MEAD, J.R.; MAHRT, J.L.; STERLING, C.R. Effects of immune colostrum and orally administered antisporezoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. **Infect. Immun.** **57**: 2283-2288, 1989.

ARYA, S.K., WONG-STAAAL, GALLO R.C. Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and  $\gamma$ -interferon messenger RNA. **J. Immunol.** **133**: 273-276, 1984.

BAXBY, D.; HART C.A.; TAYLOR, C. Human cryptosporidiosis: A possible case of hospital cross infection. **Br. Med. J. [Clin. Res.]** **287**: 1760-1761, 1983.

BIOZZI, G.; MOUTON, D.; STIFFEL, C.; SANT'ANNA, O.A.; BOUTHILLIER, Y. The genetic regulation of antibody responsiveness to natural immunogens in relation to the protective effect of vaccination. In: **PHARMACOLOGY of Immunoregulation**, London: Academic Press, 1978 p. 123-129.

- BIOZZI, G.; MOUTON, M.; SANT'ANNA, O.A.; PASSOS, H.C.; GENNARI, M.; REIS, M.H.; FERREIRA, V.C.A.; HEUMANN, A.M.; BOUTHILLIER, Y.; IBANEZ, O.M.; STIFFEL, C.; SIQUEIRA M. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **85**: 31-39, 1979.
- BIOZZI, G.; MOUTON, D.; STIFFEL, C.; BOUTHILLIER, Y. A major role of the macrophage in quantitative genetic regulation of immunoresponsiveness and anti-infectious immunity. **Adv. Immunol.** **36**: 189-233, 1984.
- BLUMBERG, R.S.; KELSEY, P.; PERRONE, T.; DICKERSIN, R.; LAQUAGLIA, M.; FERRUCI, J. Cytomegalovirus and *Cryptosporidium*-associated acalculous gangrenous cholecystitis. **Am. J. Med.** **76**: 1118-1123, 1984.
- BOSMA, M.J. The SCID mouse: a model for severe combined immune deficiency. In: WU, B. & ZHENG, J., eds. **Immune-deficient animals in experimental medicine**. Basel: S Karger, 1989 p. 1-11.
- BRASSEUR, P.; LEMETEIL, D.; BALLEET, J.J. Rat model for human cryptosporidiosis. **J. Clin. Micro.** **26(5)**: 1037-1039, 1988.
- CAMPBELL, P.N. & CURRENT, W.L. Demonstration of serum antibodies to *Cryptosporidium* sp. in normal and immunodeficient humans with confirmed infections. **J. Clin. Microbiol.** **18**: 165-169, 1983.
- CAMPBELL, I.; TZIPORI, S.; HUTCHISON, G.; ANGUS KW. Effects of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. **Vet. Rec.** **111**: 414-415, 1982.
- CASEMORE, D.P.; SANDS, R.L.; CURRY, A. *Cryptosporidium* species a new human pathogen. **J. Clin. Pathol.** **38**: 1321, 1985.

- CASEMORE, D.P. The antibody response to *Cryptosporidium* development of a serological test and its use in a study of immunologically normal persons. **J. Infect. Dis.** **14**: 125-134, 1987.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. & BODMER, W.F. In: **The genetics of human populations**. Freeman, San Francisco, 1971.
- COMBEE, C.L.; COLLINGE, M.L.; BRITT, E.M. Cryptosporidiosis in a hospital-associated day care center. **Pediat. Infect. Dis.** **5**: 528-532, 1986.
- CHAPMAN, P.; RUSH, B.; McLAUCHLIN, J. **J. Med. Microbiol.** **32**: 233-237, 1990.
- CHRISP, C.E.; REID, W.C.; RUSH, H.G.; SEDKOW, M.A.; BUSH, A.; THOMANN, M.J.H. Cryptosporidiosis in guinea pigs, an animal model. **Infect. Immun.** **58**: 674-679, 1990.
- COOK, D.F.; KELTON, J.G.; STANISZ, A.M.; COLLINS, S.M. Somatostatin treatment for cryptosporidial diarrhea in a patient with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Ann. Int. Med.** **108(5)**: 708-709, 1988.
- COUDERC, J.; BOUTHILLIER, Y.; MEVEL, J.C.; MOUTON, D. Evaluation of T helper function in lines of mice selected for high or low antibody production: Quantitative inhibition of immune responses by anti-L3-T4<sup>+</sup> monoclonal antibody. **Immunol. Lett.** **23**: 21-26, 1990.
- COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M.; OLIVEIRA, M.P.; MENDONÇA, S.C.F.; BERTHO, A.L.; DE LUCA, P.M. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell immune responses of immunocompetent and immunocompromised (AIDS) patients with american tegumentary leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **91**: 381-384, 1996.
- CRAWFORD, F.G. & VERMUND, S.H. Human cryptosporidiosis. **Crit. Rev. Microbiol.** **16**: 113-159, 1988.

- CURRENT, W.L. & LONG, P.L. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. **J. Infect. Dis.** **148**: 1108-1113, 1983.
- CURRENT, W.L.; REESE, N.C.; ERNST, J.V.; BAILEY, W.S.; HEYMAN MB, WEINSTEIN, W.M. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons: studies of an outbreak and experimental transmission. **New. Engl. J. Med.** **308**: 1252-1257, 1983.
- CURRENT, W.L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: **Acquired Immune Deficiency Syndrome**. NY, NY: AL Liss Inc., 1984 p. 355- 373.
- CURRENT, W.L. & HAYNES, T.B. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. **Science** **224**: 603-605, 1984.
- CURRENT, W.L. *Cryptosporidium*: its biology and potential for environmental transmission. **Criti. Rev. Environ. Control** **17**: 21-51, 1986.
- CURRENT, W.L. & REESE, N.C. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. **J. Protozool.** **33**: 98-108, 1986.
- CURRENT, W.L. & SNYDER, D.B. Development and serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens. **Poult. Sci.** **67**: 720-729, 1988.
- CURRENT, W.L. & BICK, P.H. Immunobiology of *Cryptosporidium* spp. **Pathol. Immunopathol. Res.** **8**: 141-160, 1989.
- CURRENT, W.L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R., eds. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1990 p. 31-49.

- D'ANTONIO, R.G.; WINN, R.E.; TAYLOR J.P.; GUSTAFSON, T.L.; CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY, G.W.; ZAJAC, R.A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Ann. Intern. Med.** **103**: 886-888, 1985.
- DATRY, A.; DANIS, M.; GENTILINI, M. Developpment complet de *Cryptosporidium* en culture cellulaire: applications. **Medecine/Sciences** **5**: 762-766, 1989.
- DOEBERITZ, M.V.K.; KOCH, S.; DRZONEK, H.; HAUSEN, H.Z. Glucocorticoid hormones reduce the expression of major histocompatibility class I antigens on human epithelial cells. **Eur. J. Immunol.** **20**: 35-40, 1990.
- DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER R., eds. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1990 p.31-49.
- ENRIQUEZ F.J. & STERLING C.R. *Cryptosporidium* infections in inbred strains of mice. **J. Protozool.** **38(6)**: 100S-102S, 1991.
- ERNEST J.A.; BLAGBURN B.L., LINDSAY D.S. Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: *Cryptosporidiae*) in neonatal mice (*Mus musculus*). **J. Parasit.** **75**: 796-798, 1986.
- FALCONER, D.S. In: **INTRODUCTION to quantitative genetics**. New York: Ronald Press, 1960.
- FAYER, R. & UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium spp* and criptosporidiosis. **Microbiol. Rev.** **50**: 458-483, 1986.
- FAYER, R.; PERRYMAN, L.E.; RIGGS, M.W. Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst chalenge. **J. Parasitol.** **75**: 151-153, 1989.

- FAYER, R.; GUIDRY, A.; BLAGBURN, B.L. Immunotherapeutic effect of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. **Infect. Immun.** **58**: 1962-1965, 1990.
- FAYER, R.; SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. In: DUBEY, JP, SPEER CA, and FAYER R, eds. **Cryptosporidiosis in Man and Animals**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1990a p. 1-29.
- FERTSCH-RUGGIO, D.; SCHOENBERG, D.R.; VOGEL, S.N. Induction of macrophage Ia antigen expression by rIFN- $\gamma$  and down regulation by IFN- $\alpha/\beta$  and dexamethasone are regulated transcriptionally. **J. Immunol.** **141**: 1582-1589, 1988.
- FLANIGAN, T.P.; AJI T.; MARSHALL, R.; SOAVE, R.; AIKAWA, M.; KAETZEL, C. Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. **Infect. Immun.** **59(1)**: 234-239, 1991.
- FORGACS, P.A.; TARCHIS, P.; MA P.; FEDERMAN, L.; MELE, L.; SILVERMAN, M.L.; SHEA, J.A. Intestinal and bronchial cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man. **Ann. Intern. Med.** **99**: 793-794, 1983.
- GARCIA, L.S.; BRUCKNER, D.A.; BREWER T.C., SHIMIZU, R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.** **18**: 185-190, 1983.
- GARCIA, L.S.; BREWER, T.C.; BRUCKNER, D.A. Fluorescent detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. **J. Clin. Microbiol.** **25**: 119-121, 1987.
- GARZA, D.H.; FEDORAK, R.N.; SOAVE, R. Enterotoxin-like activity in cultured cryptosporidia: role in diarrhea. **Gastroenterology** **90**: 1424, 1986.



- GLASEBROOK, A.L.; SARMIENTO, M.; LOKEN, M.R.; DIALYNAS, D.P.; QUINTANS, J.; EISENBERG, L.; LUTZ, C.T.; WILDE, D.; FITCH, F.W. Murine T lymphocytes clones with distinct immunological functions. **Immunol. Rev.** **54**:225-266, 1981.
- GLASEBROOK, A.L. & FITCH, F.W. Derivation of T cell clones. In: KENNETT, R.H.; BECHTOL, K.B.; MCKEARN, T.J., eds. **Monoclonal antibodies and functional cell lines**. New York: Plenum, 1984 p. 413-417.
- GROSS, T.L.; WHEAT, J., BARLETT, M.; O'CONNOR. AIDS and multiple system involvement with *Cryptosporidium*. **Am. J. Gastroenterol.** **81**: 456-458, 1986.
- GUARDA, L.A.; STEIN, S.A.; CLEARY, K.A.; ORDONEZ, N.G. Human cryptosporidiosis in the acquired immune deficiency syndrome. **Arch. Pathol. Lab. Med.** **107**: 562-566, 1983.
- GUDERIAN, R.H.; SANDOVAL, C.A.; MACKENZIE, C.D. Cryptosporidiosis in ecuadorian children with acute diarrhea. **J. Trop. Pediatr.** **32**: 290-292, 1986.
- HARP, J.A.; WANNEMUEHLER, M.W.; WOODMANSEE, D.B.; MOON, H.W. Susceptibility of germfree or antibiotic treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. **Infect. Immun.** **56**: 2006-2010, 1988.
- HARP, J.A.; WOODMANSEE, D.B.; MOON, H.W. Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum* - Effects of age and previous exposure. **Infect. Immun.** **58**: 2237-2240, 1990.
- HARP, J.A. & MOON, H.W. Susceptibility of mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice to *Cryptosporidium parvum*. **Infect. Immun.** **59**: 718-720, 1991.

- HARP, J.A. & WHITMIRE, W.M. *Cryptosporidium parvum* infection in mice: inability of lymphoid cells or culture supernatants to transfer protection from resistant adults to susceptible infants. **J. Parasitol.** **77(1)**: 170-172, 1991.
- HARP, J.A.; FRANKLIN, S.T.; GOFF, G.P.; NONNECKE, B.J. Effects of *Cryptosporidium parvum* infection on lymphocyte phenotype and reactivity in calves. **Vet. Immunol. Immunopathol.** **44(2)**: 197-207, 1995.
- HAWKINS, S.P.; THOMAS, R.P.; TEASDALE, C. Acute pancreatitis: a new finding in *Cryptosporidium* enteritis. **Br. Med. J.** **294**: 483-484, 1987.
- HEIJBEL, H.; SLAINE, K.; SEIGEL, B.; WALL, P.; MCNABB, S.J.; GIBBONS, W.; ISTRE, G.R. Outbreak of diarrhea in a day care center with spread to household members: the role of *Cryptosporidium*. **Pediat. Infect. Dis.** **6**: 532-535, 1987.
- HEINE, J.; POHLENZ, J.F.L.; MOON, H.W.; WOODE, G.N. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. **J. Infect. Dis.** **150**: 768-775, 1984.
- HEINE, J.; MOON, H.W., WOODMANSSE, D.B. Persistent cryptosporidiosis infection in congenitally athymic nude mice. **Infect. Immun.** **43**: 856-859, 1984a.
- HENRICKSON, S.A. & PHOLENZ, J.F.L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta. Vet. Scand.** **22**: 594-596, 1981.
- HINNANT, K.; SWARTZ, A.; ROTTERDAM, H.; RUDSKI, C. Cytomegalovirus and cryptosporidial cholecystitis in two patients with AIDS. **Am. J. Surg. Pathol.** **13**: 57-60, 1989.

- HOJLYNG, N.; MOLBACK, K.; JEPSEN, S. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea in Liberian Children. **J. Clin. Microbiol.** **23**: 1109-1113, 1986.
- HOLLEY, H.P.JR. & THIERS, BH. Cryptosporidiosis in a patient receiving immunosuppressive therapy. Possibly activation of latent infection. **Dig. Dis. Sci.** **31**: 1004-1007, 1986.
- HOLMGREN, J. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. **Nature (Lond.)** **292**: 413,1981.
- IBANEZ, O.M.; MOUTON, D.; OLIVEIRA, S.L.; RIBEIRO FILHO, R.G.; PIATTI, R.M.; SANT'ANNA, O.A.; MASSA, S; BIOZZI, G; SIQUEIRA, M. Polygenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. **Immunogenetics** **28**: 6-12, 1988.
- KASSA, M.; COMBY, E.; LEMETEIL, D.; BRASSEUR, P.; BALLEET, J. Characterization of anti-*Cryptosporidium* IgA antibodies in sera from immunocompetent individuals and HIV-infected patients. **J. Protozool.** **38(6)**: 179S-180S, 1991.
- KATZ, M.D.; ERSTAD, B.L.; ROSE, C. Treatment of severe *Cryptosporidium*-related diarrhea with octreotide in a patient with AIDS. **Drug Intell. Clin. Pharm.** **22**: 134-136, 1988.
- KHAN, D.G.; GARFINKLE, J.M.; KLONOFF, D.C.; PEMBROOK, L.J.; MORROW, D.J. Cryptosporidial and cytomegaloviral hepatitis and cholecystitis. **Arch. Pathol. Lab. Med.** **111**: 879-881, 1987.
- KIM, C.W.; JOEL, D.; WOODMANSEE, D.; LUFT, B.J. Experimental cryptosporidiosis in fetal lambs. **J. Parasitol.** **74**: 1064-1067, 1988.

- KLESIOUS, P.H. & KRISTENSEN, F. Bovine transfer factor: effect on bovine and rabbit coccidiosis. **Clin. Immunol. Immunopathol.** **7**: 240-252, 1977.
- KLESIOUS, P.H.; QUALS, D.F.; ELSTON, A.L.; FUDENBERG, H.H. Effects of bovine transfer factor (Tfd) in mouse coccidiosis (*Eimeria ferresi*). **Clin. Immunol. Immunopathol.** **10** : 214-221, 1978.
- KLESIOUS P.H.; HAYNES, T.B.; MALO, L.K. Infectivity of *Cryptosporidium* sp isolated from wild mice for calves and mice. **J. Vet. Med. Assoc.** **189**: 192-193, 1986.
- KOCH, K.L.; PHILLIPS, D.J.; ABER, R.C.; CURRENT, W.L. Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission. **Ann. Intern. Med.** **102**: 593-596, 1985.
- KOCOSHIS, S.A.; CIBULL, M.L.; DAVIS, T.E.; HINTON, J.T.; SEIP, M.; BANWELL, J.G. Intestinal and pulmonary cryptosporidiosis in an infant with severe combined immune deficiency. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** **3**: 149-157, 1984.
- KOGUT, M.H. & LANGE, C. Interferon- $\gamma$ -mediated inhibition of the development of *Eimeria tenella* in cultured cells. **J. Parasitol.** **75**: 313-317, 1989.
- KORICH, D.G.; MEAD, J.R.; MADORE, M.S.; SINCLAIR, N.A.; STERLING, C.R. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium* oocyst viability. **Appl. Environ. Microbiol.** **56**: 1423-1428, 1990.
- LASSER, K.H.; LEWIN, K.J.; RYNING, F.W. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammagobulinemia. **Hum. Pathol.** **10**: 234-240, 1979.

- LAXER, M.A.; ALCANTARA, A.K.; JAVATO-LAXER, M.; MENORCA, D.M.; FERNANDO, M.T.; RANOA, C.P. Immune response to cryptosporidiosis in Philippine children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **42**: 131-139, 1990.
- LEVINE, N.D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **J. Protozool.** **31**: 94-98, 1984.
- LUMB, R.; SMITH, K.; O'DONOGHUE, P.J.; LANSER, J.A. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. **Parasit. Res.** **74**: 531-536, 1988.
- MA, P. *Cryptosporidium* - biology and diagnosis. **Adv. Exp. Med. Biol.** **202**: 135, 1986.
- MA, P. & SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **J. Infect. Dis.** **147**: 824-828, 1983.
- MA, P. In: REMINGTON, J. & SCHWARTZ, M., eds. **Current Clinical Topics in Infectious Diseases**. McGraw-Hill Book Co., New York, 1987, p. 99.
- MACKENSIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **N. Engl. J. Med.** **331**: 161-167, 1994.
- MARCIAL, M.A. & MADARA, J.L. *Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. **Gastroenterology** **90(3)**: 583-594, 1986.
- MASSA S. In **Infecção por *Salmonella* *tiphymurium* em camundongos bons e maus produtores de anticorpos**. São Paulo, 1990 (tese de mestrado/Instituto de Ciências Biomédicas-USP), 1990.

- MATA, L.; BOLANOS, H.; PEZZARO, D.; VIVES, M. Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican rural and urban areas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **33**: 24-29, 1984.
- MATA, L. *Cryptosporidium* and other protozoa in diarrheal disease in less developed countries. **Pediatr. Infect. Dis.** **5**: 117-130, 1986.
- MCDONALD, V.; STABLES, R.; WARHURST, D.C.; BARER, M.R.; BLEWETT, D.A.; CHAPMAN, H.D.; CONOLLY, G.M.; CHIODINI P.L.; MCADAM, K.P.W.J. In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. **Antimicrob. Chemother.** **34**: 1498-1500, 1990.
- MCDONALD, V.; DEER, R.; UNI, S.; ISEKI, M.; BANCROFT, G.J. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. **Infect. Immun.** **60(8)**: 3325-3331, 1992.
- MCDONALD, V. & BANCROFT, G.H. Mechanisms of innate and acquired resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. **Parasite Immunol.** **16(6)**: 315-320, 1994.
- MCMEEKING, A.; BORKOWSKY, W.; KLESIOUS, P.H.; BONK, S., HOLZMAN, R.S.; LAWRENCE, H.S. A controlled trial of bovine dialyzable leucocyte extract for cryptosporidiosis in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.** **161**: 108-112, 1990.
- MEAD, G.M.; SWEETENHAM, J.W.; EWINS, D.L.; FURLONG, M.; LOWES, J.A. Intestinal cryptosporidiosis: a complication of cancer treatment. **Cancer Treat. Rep.** **70**: 769-770, 1986.

- MEAD, J.R.; ARROWOOD, M.J.; CURRENT, W.L.; STERLING, C.R. Field inversion gel electrophoretic separation of *Cryptosporidium* spp chromosome-sized DNA. **J. Parasitol.** **74(3)**: 366-369, 1988.
- MEAD, J.R.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. **J. Parasitol.** **74**:135-143, 1988a.
- MEAD, J.R.; HUMPHREYS, R.C.; SAMMONS, D.W.; STERLING, C.R. Identification of an isolate-specific sporozoite proteins of *Cryptosporidium parvum* by two-dimensional gel electrophoresis. **Infect. Immun.** **58(7)**: 2071-2075, 1990.
- MEAD, J.R.; ARROWOOD, M.J.; SIDWELL, R.W.; HEALEY, M.C. Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. **J. Infect. Dis.** **163**: 1297-1304, 1991.
- MEAD, J.R.; ARROWOOD, M.J.; HEALEY, M.C.; SIDWELL, R.W. Cryptosporidial infections in SCID mice reconstituted with human and murine lymphocytes. **J. Protozool.** **38(6)**: 59S-62S, 1991a.
- MIESEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overwhelming diarrhea associated with *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. **Gastroenterology** **70**: 1156-1160, 1976.
- MILLARD, P.S.; GENSHEIMER, K.F.; ADDISS, D.G. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **JAMA** **272**: 1592-1596, 1994.
- MILLER, R.A.; HOLMBERG, R.E.; CLAUSEN, C.R. Life-threatening diarrhea caused by *Cryptosporidium* in a child undergoing therapy for acute lymphocytic leukemia. **J. Pediatr.** **103**: 256-259, 1983.

- MILLER, R.A.; BRONSDON, R.E.; MORTON, W.R.. Experimental cryptosporidiosis in a primate model. **J. Infect. Dis.** **161**: 312-315, 1990.
- MISHELL, B.B. & SHIIGI, S.M. In: **Selected methods in cellular immunology**. San Francisco: WH Freeman and Company, 1980.
- MODIGLIANI, R.; BORIES, C.L.E.; CHARPENTIER, Y.; SALMERON, M.; MESSING, B.; GALIAN, A.; RAMBAUD, J.C.; LAVERGNE, A.; COCHAND PRIOLLET, B.; DESPORTES, I. Diarrhoea and malabsorption in acquired immune deficiency syndrome: a study of four cases with special emphasis on opportunistic protozoan infestations. **Gut** **26**: 179, 1985.
- MOON, H.W.; WOODMANSEE, D.B.; HARP, J.A.; ABLE, S.; UNGAR, B.L.P. Lactal immunity to enteric cryptosporidiosis in mice: immune dams do not protect their suckling pups. **Infect. Immun.** **56**: 649-653, 1988.
- MOSS, D.M. & LAMMIE, P.J. Proliferative responsiveness of lymphocytes from *Cryptosporidium parvum*-exposed mice to two separate antigen fractions from oocysts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **49(3)**: 393-401, 1993.
- MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y.; MEVEL, J.C.; BIOZZI, G. Genetic selection for antibody responsiveness in mice: further evidence for inverse modification of macrophage catabolic activity without alteration of the expression of T-cell mediated immunity. **Annales d'Immunologie** **135D**-173, 1984.
- MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; SANT'ANNA, O.A.; BOUTHILLIER, J.; REIS, M.H.; PIATTI, R.M.; STIFFEL, C.; BIOZZI, G. Genetic regulation of multispecific antibody responsiveness: improvement of "high" and "low" characters. **Eur. J. Immunol.** **18**: 41-49, 1988.
- NAVIN, T.R. & JURANEK, D.D. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic and parasitologic review. **Rev. Infect. Dis.** **6**: 313-327, 1984.



- NIME, F.A.; BURKE, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHER, M.A.; YARDLEY J.H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology** **70**: 592-598, 1976.
- NORD, J; MA, P.; DIJOHN, D.; TZIPORI, S.; TACKET, C.O. Treatment with bovine hyperimmune colostrum of cryptosporidial diarrhea in AIDS patients. **AIDS** **4**: 581-584, 1990.
- NOVAK, M.; BUCHANNAN, L.G.; HOWLADER, H. Effects of ciclophosphamide and dexamethasone on mast cell populations in *Hymenolepis microstoma*-infected mice. **Parasitology** **100**: 337-343, 1990.
- OTT, L. A nonparametric alternative: the Wilcoxon rank sum test. In: L. OTT ed. **An introduction to statistical methods and data analysis**. PWS Kent Publishing Co., Boston, 1988, p. 138-188.
- PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. **Vet. Pathol.** **8**: 479-484, 1971.
- PERRYMAN, L.E.; RIGGS, M.W.; MASON, P.H.; FAYER, R. Kinetics of *Cryptosporidium parvum* neutralization by monoclonal antibodies, immune bovine serum, and immune bovine colostrum. **Infec. Immun.** **58**: 257-259, 1990.
- PFEFFERKORN, E.R. Interferon- $\gamma$  blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cell to degrade tryptophan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **81**: 908-912, 1984.
- POHLENZ, J.; MOON, H.W.; CHEVILLE, N.F.; BEMRICK, W.J. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. **JAVMA** **172**: 452-457, 1978.

- POHJOLA, S.H.; ONKSAANEN, H.; JOKIPII, L.; JOKIPII, A.M.  
Dimethylsulphoxide-Ziehl-Neelsen technique for detection of cryptosporidial oocysts. **Vet. Rec.** **115**: 442-443, 1984.
- PORTNOY, D.; WHITESIDE, M.E.; BUCKLEY III, E.; MACLEOD, C.L.  
Treatment of intestinal cryptosporidiosis with spiramycin. **Ann. Int. Med.** **101**: 202-204, 1984.
- PTILIK, S.; FAINSTEIN, V.; RIOS, A.; GUARDA, L.; MANSELL, P.W.A, HERSH M.  
Cryptosporidial cholecystitis. **N. Engl. J. Med.** **308**: 967, 1983.
- RASMUSSEN, K.R.; MARTIN, E.G.; ARROWOOD, M.J.; HEALEY, M.C. Effects of dexamethasone and dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. **J. Protozool.** **38(6)**: 157S-159S, 1991.
- RASMUSSEN, K.R. & HEALEY, M. *Cryptosporidium parvum*: experimental infections in aged syrian golden hamsters. **J. Infect. Dis.** **165**: 769-772, 1992.
- RASMUSSEN, K.R. & HEALEY, M. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. **Infect. Immun.** **60**: 1648-1652, 1992a.
- RASMUSSEN, K.R.; MARTIN, E.G.; HEALEY, M.C. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. **J. Parasitol.** **79(3)**: 363-370, 1993.
- REESE, N.C.; CURRENT, W.L.; ERNST, J.V.; BAILEY, W.S. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **31(2)**: 226-229, 1982.

- REGH, J.E.; HANCOCK, M.L.; WOODMANSEE, D.B. Characterization of cyclophosphamide rat model of cryptosporidiosis. **Infect. Immun.** **55**: 2669-2774, 1987.
- REGH, J.E.; HANCOCK, M.L.; WOODMANSEE, D.B. Characterization of a dexamethasone-treated rat model of cryptosporidial infection. **J. Infect. Dis.** **158**: 1406-1407, 1988.
- REGH, J.E. Activity of azithromycin against Cryptosporidia in immunosuppressed rats. **J. Infect. Dis.** **163**: 1293-1296, 1991.
- REIS, M.H.; IBÁÑEZ, O.M.; CABRERA, W.H.; RIBEIRO, O.G.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; COUDERC, J. T helper functions in lines of mice selected for high or low antibody production: Modulation BY anti-CD4<sup>+</sup> monoclonal antibody. **Immunology** **75**: 80-85, 1992.
- ROITT, I.M. BROSTOFF J, MALE DK. The lymphoid system. In: ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K., eds. **Immunology**. 3 ed., London: Mosby, 1993, chapter 3.
- ROSE, M.E. Host immune responses. In: LONG, P.L., ed., **The biology of the coccidia**. Baltimore: University Park Press, 1982, p. 329-371.
- SCHNEIDERMAN, D.J.; CELLO, J.P.; LAING, F.C. Pappillary stenosis and sclerosing cholangitis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Intern. Med.** **106**: 546-54, 1987.
- SHERWOOD, D.K.; ANGUS, K.W.; SNODGRASS, D.R.; TZIPORI, S. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. **Infect. Immun.** **38**: 471-475, 1982.

- SCHREIBER, R.D.; HICKS, L.J.; CELADA, A.; BUCHMEIR, N.A.; GRAY, A. Monoclonal antibodies to murine gamma interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity, **J. Immunol.** **134**: 1609-1618, 1985.
- SLOPER, K.S.; DOURMASHKIN, R.R.; BIRD, R.B.; SLAVIN, G.; WEBSTER, A.D.B. Chronic malabsorption due to cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency. **Gut** **23**: 80-82, 1982.
- SOAVE, R. & ARMSTRONG, D. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **Rev. Infect. Dis.** **8**: 1012-1023, 1985.
- SOAVE, R. & JOHNSON, W.D. *Cryptosporidium* and *Isospora belli* infection. **J. Infect. Dis.** **157**: 225-229, 1988.
- STERLING, C.R.; SEEGAR, K.; SINCLAIR, N.A. *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea [letter]. **J. Infect. Dis.** **155**: 380-381, 1986.
- STERLING, C.R. & ARROWOOD, M. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. **Pediatr. Infect. Dis.** **5**: S139-S142, 1986.
- STEHR-GREEN, J.K.; MCCAIG, L.; REMSEN, H.M.; RAINS, C.S.; FOX, M.I.; JURANEK, D.D. Shedding of oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **36**: 338-342, 1987.
- STIFFEL, C.; IBANEZ, O.M.; RIBEIRO, O.G. Decreusefond C, Siqueira M, Mouton D, Biozzi G. Genetic regulation of the specific and non-specific component of immunity. **Immunology letters** **16**: 205-218, 1987.

- TAGHI-KILANI, R.; SEKLA, L.; HAYGLASS, K.T. The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. infection studies with B cell-depleted mice. **J. Immunol.** **145**: 1571-1576, 1990.
- TILLEY, M. & UPTON, S.J. Electrophoretic characterization of *Cryptosporidium parvum* (KSU-1 isolate) (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Can. J. Zool.** **68**: 1513-1519, 1990.
- TILLEY, M.; FAYER, R.; GUIDRY, A.; UPTON, S.J.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) oocysts and sporozoite antigens recognized by bovine colostrum antibodies. **Infect. Immun.** **58**: 2966-2971, 1990.
- TILLEY, M.; UPTON, S.J.; BLAGBURN, B.L.; ANDERSON, B.C. Identification of outer oocyst wall proteins of three *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) species by <sup>125</sup>I surface labeling. **Infect. Immun.** **58**: 252-253, 1990a.
- TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **5**: 12, 1907.
- TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; CAMPBELL, I.; GRAY, E.W. *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. **Infect. Immun.** **30**: 884-886, 1980.
- TZIPORI, S.; LARSEN, J.; SMITH, M.; LEUFL, R. Diarrhea in goat kids attributed to *Cryptosporidium* infection. **Vet. Rec.** **111**: 35-36, 1982.
- TZIPORI, S.; CAMPBELL, I.; ANGUS, K.W. The therapeutic effect of 16 antimicrobial agents on *Cryptosporidium* infection in mice. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** **60**: 187-190, 1982a.
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in man, domestic animals, and humans. **Microbiol. Rev.** **47**: 84-96, 1983.

- TZIPORI, S.; ROBERTON, D.; CHAPMAN, C. Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in a immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. **Br. Med. J.** **293**: 1276-1277, 1986.
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in perspective. **Adv. Parasitol.** **27**: 63-129, 1988.
- UNGAR, B.L.P. & NASH, T.E. Quantification of specific antibody response to *Cryptosporidium* antigens by laser densitometry. **Infect. Immun.** **53**: 124-128, 1986.
- UNGAR, B.L.P.; SOAVE, R.; FAYER, R.; NASH, T.E. Enzyme immuno assay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. **J. Infect. Dis.** **153**: 570-578, 1986.
- UNGAR, B.L.P.; MULLIGAN, M.; NUTMAN, T.R. Serologic evidence of *Cryptosporidium* infection in US volunteers before and during Peace Corps service in Africa. **Arch. Intern. Med.** **149**: 894-897, 1989.
- UNGAR, B. Cryptosporidiosis in humans. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R., eds. **Cryptosporidiosis in Man and Animals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990, p. 59-82.
- UNGAR, B.L.P.; WARD, D.J.; FAYER, R.; QUINN, C.A. Cessation of *Cryptosporidium*-associated diarrhea in a acquired immunodeficiency syndrome patient after treatment with bovine colostrum. **Gastroenterology** **98**: 486-488, 1990.
- UNGAR B.L.P.; BURRIS, J.A.; QUINN, C.A.; FINKELMAN, F.D. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. **Infect. Immun.** **58**: 961-969, 1990a.

- UNGAR, B.L.P.; KAO, T.; BURRIS, J.A.; FINKELMAN, F.D. *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model: Independent roles for IFN- $\gamma$  and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in protective immunity. **J. Immunol.** **147(3)**: 1014-1022, 1991.
- VACCA, A.; MARTINOTTI, S.; SCREPANTI, I.; MARODER, M.; FELLI, M.P.; FARINA, A.R.; GISMONDI, A.; SANTONI, A.; FRATI, L.; GULINO, A. Transcriptional regulation of the interleukin 2 gene by glucocorticoid hormones - Role of steroid receptor and antigen-responsive 5'-flanking sequences. **J. Biol. Chem.** **265**: 8075-8080, 1990.
- WEISBURGER, W.R.; HUTCHEON, D.F.; YARDLEY, J.H.; ROCHE, J.C.; HILLIS, W.D.; CHARACHE, P. Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. **Am. J. Clin. Pathol.** **72**: 473-478, 1979.
- WHITMIRE, M.W. & HARP, J.A. In vitro murine lymphocyte blastogenic responses to *Cryptosporidium parvum*. **J. Parasitol.** **76(3)**: 450-452, 1990.
- WITTENBERG, D.F.; MILLER, N.M.; VAN DEN ENDE, J. Spiramycin is not effective in treating *Cryptosporidium* diarrhea in infants: results of a double-blind randomized trial. **J. Infect. Dis.** **159**: 131-132, 1989.

## 10. ANEXO

O trabalho **“Incomplete dominance of the low antibody response to *Cryptosporidium parvum* antigens in mice selected for high (H) and low (L) antibody responsiveness”** foi aceito para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research em agosto de 1996.

Encontra-se em fase de preparação o manuscrito **“Standardization of conditions for the production of *Cryptosporidium parvum*-specific T cell lines and clones”**.



# Incomplete dominance of the low antibody response to *Cryptosporidium parvum* antigens in mice selected for high and low antibody responsiveness

M.C.A. Teixeira<sup>1,2</sup>,  
N.M. Alcântara-Neves<sup>1,3</sup>,  
C.R. Sterling<sup>4</sup>,  
L.C. Pontes-de-Carvalho<sup>1</sup>  
and O.A. Sant'Anna<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz and

<sup>2</sup>Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, 40295-001 Salvador, BA, Brasil

<sup>3</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 40110-100 Salvador, BA, Brasil

<sup>4</sup>Department of Veterinary Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA

<sup>5</sup>Laboratório de Imunogenética, Instituto Butantan, 05503-900 São Paulo, SP, Brasil

## Abstract

The humoral antibody response to *Cryptosporidium* was investigated in mice genetically selected for high (H) and low (L) antibody responsiveness. Groups of 4-5 mice from two different selections, general primary (GP) and general secondary (GS), were studied. Following immunization with *Cryptosporidium parvum* antigens, the maximum levels of IgG in the H<sub>GP</sub> ( $\bar{X} \pm SD = 1.13 \pm 0.35$ , N = 5) and in the H<sub>GS</sub> ( $0.42 \pm 0.15$ , N = 4) lines, and of IgM in the H<sub>GP</sub> line ( $0.86 \pm 0.53$ , N = 5) were significantly higher than those in their L counterparts ( $0.04 \pm 0.02$ , N = 5;  $0.05 \pm 0.02$ , N = 4 and  $0.24 \pm 0.07$ , N = 5, respectively). These findings were similar to those reported for other immunogens. However, the IgG ( $0.22 \pm 0.05$ , N = 4) and the IgM ( $0.33 \pm 0.08$ , N = 4) responses to immunization of F<sub>1</sub> (L<sub>GP</sub> x H<sub>GP</sub>) hybrids indicated an incomplete dominance of the low response, in contrast to the incomplete dominance of the high response described for many other antigens and representing an important exception. In addition, the H, L and F<sub>1</sub> mice did not develop detectable infections when inoculated with live *Cryptosporidium* oocysts, supporting the view that a reduced or zero antibody production itself is not enough to permit the establishment of *Cryptosporidium* infection in adult mice.

## Key words

- *C. parvum*
- Genetic control of antibody response
- Immunization
- Antibody responsiveness

## Correspondence

M.C.A. Teixeira  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz  
Fundação Oswaldo Cruz  
Rua Waldemar Falcão, 121  
40295-001 Salvador, BA  
Brasil  
Fax: 55 (071) 359-2255  
E-mail: limc@cpqgm.fiocruz.br

Research supported by CNPq  
(No. 402821.89). Publication  
supported by FAPESP.

Received December 1, 1995  
Accepted August 1, 1996

## Introduction

Results from several independent bidirectional genetic selections in mice for high (H) and low (L) antibody responsiveness have demonstrated that this character is subjected to polygenic regulation, the selected high- or low-response alleles being endowed with a multispecific characteristic, since they control high or low antibody pro-

duction of many unrelated specificities.

In an attempt to combine all the genetic information accumulated in five original selections (selections I-V), two new selective processes were carried out, GP (general primary) selection and GS (general secondary) selection (1). The selective pressures were based on the intensity of the primary or secondary antibody responses to antigens utilized in the original selections, namely

flagellar and somatic antigens of *Salmonella*, heterologous proteins and erythrocytes (1). For all antigens tested so far, there is a complete or partial genetic dominance of the H character (2).

Adult H and L mice have the same T-cell effector function (3). An immunological parameter that is clearly affected by the selective breeding is macrophage function. Macrophage catabolism is markedly more intense in low than in high responders (4), so that L mouse macrophages are poor antigen-presenting cells (5) and eliminate intracellular pathogens more efficiently than H macrophages (2).

*Cryptosporidium parvum* is a protozoan that causes diarrhea in mammals, including human beings, particularly in young and/or immunodeficient hosts (6). Immunological studies in animals with cryptosporidiosis suggest that both humoral and cellular immune responses may play a role in the defense against infection (7,8). Moreover, intact and partially digested *Cryptosporidium* merozoites and trophozoites were observed inside macrophages underlining the intestinal mucosa of infected guinea pigs (9), indicating that these cells also play a role in controlling the infection.

The objective of the present study was to determine if mice from H and L lines respond to *Cryptosporidium* antigens as reported for other antigens, as well as to characterize the genetic dominance or recessiveness of the L (and conversely of the H) character. In addition, the susceptibility of the mice to *Cryptosporidium* infection was investigated.

## Material and Methods

### Mice

The H- and L-responder lines of GP and GS selections (1) were maintained at the Laboratory of Immunogenetics of Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. Reciprocal in-

terline crosses [ $F_1$  ( $L_{GP} \times H_{GP}$ )] were bred in the same animal unit. Two- to four-month old mice were used in all experiments.

### Oocyst preparation and oocyst lysate

*Cryptosporidium parvum* oocysts were obtained from the feces of an experimentally infected calf and purified by discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients as described before (10). Purified oocysts were stored at 4°C in 2.5% potassium dichromate solution. Oocysts were lysed by pulse sonication in six to eight 30-sec cycles (Branson Sonifier, Branson Instruments, Danbury, CT) and stored at -20°C. Protein concentration of the lysate was determined by the method of Lowry et al. (11) using bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) as a standard.

### Immunization and preparation of sera

Groups of 4-5 H, L and  $F_1$  mice were immunized intraperitoneally with 40 µg of crude *Cryptosporidium* protein mixed with 200 µg of  $Al(OH)_3$ . They were bled from the retro-orbital venous plexus before, and 5, 11, 15 and 39 days after immunization. Sera were stored at -20°C.

### Inoculation of mice with oocysts and assessment of infection

Groups of 6-8 H, L and  $F_1$  mice were inoculated intragastrically with  $2 \times 10^6$  purified oocysts (stored for less than 4 months) per animal. Oocyst excretion was monitored by collecting fecal pellets every second day. Samples were mixed with 10% formalin, smeared onto slides and stained using a modified acid fast staining technique (12). Mice were sacrificed during the second week (days 8 to 14) or on day 30 after inoculation. Sections of ileum were collected and processed for examination by light microscopy after staining with hematoxylin-eosin according to standard techniques.

flagellar and somatic antigens of *Salmonella*, heterologous proteins and erythrocytes (1). For all antigens tested so far, there is a complete or partial genetic dominance of the H character (2).

Adult H and L mice have the same T-cell effector function (3). An immunological parameter that is clearly affected by the selective breeding is macrophage function. Macrophage catabolism is markedly more intense in low than in high responders (4), so that L mouse macrophages are poor antigen-presenting cells (5) and eliminate intracellular pathogens more efficiently than H macrophages (2).

*Cryptosporidium parvum* is a protozoan that causes diarrhea in mammals, including human beings, particularly in young and/or immunodeficient hosts (6). Immunological studies in animals with cryptosporidiosis suggest that both humoral and cellular immune responses may play a role in the defense against infection (7,8). Moreover, intact and partially digested *Cryptosporidium* merozoites and trophozoites were observed inside macrophages underlining the intestinal mucosa of infected guinea pigs (9), indicating that these cells also play a role in controlling the infection.

The objective of the present study was to determine if mice from H and L lines respond to *Cryptosporidium* antigens as reported for other antigens, as well as to characterize the genetic dominance or recessiveness of the L (and conversely of the H) character. In addition, the susceptibility of the mice to *Cryptosporidium* infection was investigated.

## Material and Methods

### Mice

The H- and L-responder lines of GP and GS selections (1) were maintained at the Laboratory of Immunogenetics of Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. Reciprocal in-

terline crosses [ $F_1$  ( $L_{GP} \times H_{GP}$ )] were bred in the same animal unit. Two- to four-month old mice were used in all experiments.

### Oocyst preparation and oocyst lysate

*Cryptosporidium parvum* oocysts were obtained from the feces of an experimentally infected calf and purified by discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients as described before (10). Purified oocysts were stored at 4°C in 2.5% potassium dichromate solution. Oocysts were lysed by pulse sonication in six to eight 30-sec cycles (Branson Sonifier, Branson Instruments, Danbury, CT) and stored at -20°C. Protein concentration of the lysate was determined by the method of Lowry et al. (11) using bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) as a standard.

### Immunization and preparation of sera

Groups of 4-5 H, L and  $F_1$  mice were immunized intraperitoneally with 40 µg of crude *Cryptosporidium* protein mixed with 200 µg of  $Al(OH)_3$ . They were bled from the retro-orbital venous plexus before, and 5, 11, 15 and 39 days after immunization. Sera were stored at -20°C.

### Inoculation of mice with oocysts and assessment of infection

Groups of 6-8 H, L and  $F_1$  mice were inoculated intragastrically with  $2 \times 10^6$  purified oocysts (stored for less than 4 months) per animal. Oocyst excretion was monitored by collecting fecal pellets every second day. Samples were mixed with 10% formalin, smeared onto slides and stained using a modified acid fast staining technique (12). Mice were sacrificed during the second week (days 8 to 14) or on day 30 after inoculation. Sections of ileum were collected and processed for examination by light microscopy after staining with hematoxylin-eosin according to standard techniques.

## ELISA

ELISA was carried out as described elsewhere (13). Microtiter plates (Immulon II, Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) were coated by incubation with 1 µg of crude *Cryptosporidium* antigens in 100 µl of 0.15 M sodium phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, followed by incubation with 1/100 dilutions of test sera in PBS containing 0.5% casein, antibodies against mouse IgG or IgM conjugated to peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) and the substrate tetramethylbenzidine (Kirkegard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD).

## Statistical and genetic analysis

The statistical significance of differences in antibody levels in the groups of mice was evaluated by the Wilcoxon rank-sum test.

The dominance effect is reported as the  $d/a$  ratio, where  $a$  is the additive effect of the response to selection, and  $d$  is the global dominance, calculated with the following formulae:

$$a = \frac{\bar{X}_H - \bar{X}_L}{2} \quad \text{and} \quad d = \bar{X}_{F_1} - \left[ \frac{\bar{X}_H + \bar{X}_L}{2} \right]$$

where  $\bar{X}_H$ ,  $\bar{X}_L$  and  $\bar{X}_{F_1}$  correspond to the arithmetic means of the results from the H, L and  $F_1$  mice, respectively (14).

## Results

*Cryptosporidium* antibody levels in immunized mice

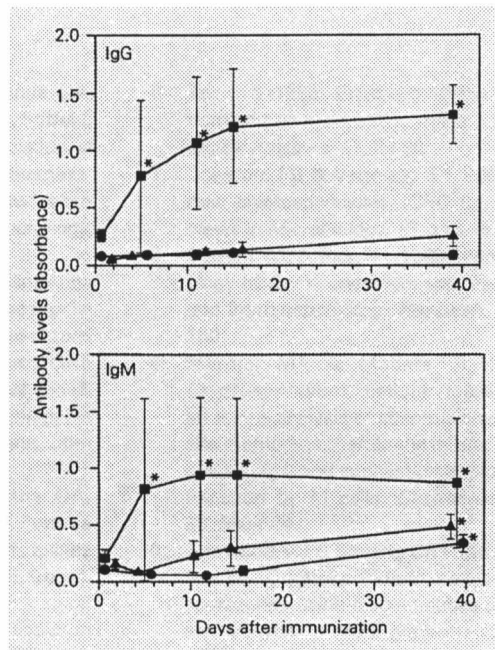
The H mice of both GP and GS selections responded to the immunization with *Cryptosporidium* antigens with the production of IgG antibodies. The difference in the concentrations of these antibodies between L and H lines was statistically significant for both selections (Table 1). In fact, there were no detectable IgG antibodies in the L lines (Table 1 and Figure 1). Results consistent with the characteristics described for the lines were also observed for the IgM *Cryptosporidium* antibody response in the GP selection (Table 1 and Figure 1). However, there was no statistically significant difference between

Table 1 - Response of IgM and IgG by high antibody-producer, low antibody-producer and  $F_1$  mice immunized with *Cryptosporidium parvum* antigens.

Mice were immunized with 40 µg *Cryptosporidium* antigens and bled on days 0, 5, 11, 15 and 39 post-immunization. H, High antibody producers; L, low antibody producers;  $F_1$ , generation resulting from crosses between H and L parents. Data are reported as the mean ± SD of the absorbance of the highest antibody levels, obtained from individual mice (from day 11 to 39 post-immunization), determined by ELISA utilizing peroxidase conjugated to IgM- or IgG-specific antibodies, corrected for background, i.e., the results for sera obtained before immunization were subtracted. P = Statistical significance of the differences of L lines and  $F_1$  hybrids compared to the H line (Wilcoxon rank-sum test).  $a$  = Additive effect of the response to selection;  $d$  = dominance effect;  $d/a$  = global dominance effect (if  $d/a = 0$ , codominance; if  $d/a = 1$ , complete dominance of the H response; if  $d/a = -1$ , complete dominance of the L response).

Mouse selection	Mouse line or generation	N	Antibody levels and indicators of the response to selection and of dominance									
			IgG					IgM				
			Mean ± SD	P	a	d	d/a	Mean ± SD	P	a	d	d/a
GP	H	5	1.13 ± 0.35		0.54	-0.36	-0.67	0.86 ± 0.53		0.31	-0.22	-0.71
	L	5	0.04 ± 0.02	<0.01				0.24 ± 0.07	<0.01			
	$F_1$	4	0.22 ± 0.05	<0.05				0.33 ± 0.08	<0.05			
GS	H	4	0.42 ± 0.15		0.37			0.17 ± 0.10		0.05		
	L	4	0.05 ± 0.02	<0.05				0.16 ± 0.05	>0.05			

Figure 1 - *Cryptosporidium* antibody levels in mice selected for high and low antibody responsiveness (GP selection). Mice were immunized with *Cryptosporidium* antigens as described in Material and Methods. IgG and IgM antibodies were assayed by ELISA in sera collected on different days after immunization. Data are reported as means  $\pm$  SD of absorbance measured at 450 nm for 4-5 mice in each group. ■, High-responder mice; ●, low-responder mice; ▲, high x low responders, F<sub>1</sub> hybrids. \*P<0.05 compared to antibody levels before immunization.



IgM antibody levels of L and H mice in GS selection (Table 1).

The IgG and IgM antibody responses of F<sub>1</sub> (L<sub>GP</sub> × H<sub>GP</sub>) hybrids to *Cryptosporidium* antigens clearly showed an incomplete dominance of L parents (Table 1 and Figure 1).

#### Infectivity of *Cryptosporidium parvum* to H and L lines

No oocysts were observed in feces or in sections of the intestine of the H, L and F<sub>1</sub> mice orally inoculated with live oocysts from day 2 to day 30 post-inoculation (data not shown). In these groups the antibody response of both lines was very low or non-existent (data not shown).

#### Discussion

H and L lines of mice selected according to the intensity of general primary or general secondary antibody response to various antigens, namely heterologous erythrocytes, flagellar and somatic antigens of *Salmonella* and heterologous serum proteins (1), responded as expected when immunized with *Cryptosporidium* antigens.

Despite the virtual absence of specific antibody production in *Cryptosporidium*-inoculated H and L mice, these mice did not develop a detectable infection, either in terms of elimination of oocysts in the feces or ileum colonization. Although IgA antibody levels in the intestinal contents of the infected animals were not determined, it should be stressed that the antibody responsiveness of H and L mice is clearly immunoglobulin-isotype unrestricted (3,15,16), and the L lines should have produced little or no IgA antibodies as was documented here for IgG and IgM antibodies.

The present results indicate that no or a low production of antibody itself is not enough to permit the establishment of a *Cryptosporidium* infection in mice, in agreement with the report of the lack of susceptibility of neonatally anti- $\mu$ -treated adult BALB/c mice to infection with *Cryptosporidium* (17). In fact, an efficient macrophage-mediated immune reaction, which should be expected in L mice, could have been responsible for controlling the infection.

In the present study an incomplete but clear dominance of the low antibody response to *Cryptosporidium* antigens was also demonstrated. This contrasts to what has been reported for several other immunogens, such as heterologous proteins or erythrocytes, viral and bacterial antigens, the high response to which is completely or partially dominant (2). High and low responses are subjected to polygenic regulation (3), and very likely some genes determine the expression of characteristics that depress the humoral immune response and some characteristics that enhance it. F<sub>1</sub> mice will obviously inherit both types of genes. *Cryptosporidium* antigens, therefore, in contrast to other antigens, seem to more efficiently stimulate mechanisms that suppress rather than those that enhance humoral immune responses. The question of whether this constitutes an escape mechanism that facilitates *Cryptosporidium* infection in susceptible hosts deserves further investigation.

## References

1. Mouton D, Siqueira M, Sant'Anna OA, Bouthillier Y, Reis MH, Piatti RM, Stiffel C & Biozzi G (1988). Genetic regulation of multispecific antibody responsiveness: Improvement of "high" and "low" characters. *European Journal of Immunology*, 18: 41-49.
2. Biozzi G, Mouton D, Stiffel C, Sant'Anna OA & Bouthillier Y (1978). Genetic regulation of antibody responsiveness to natural immunogens in relation to the protective effect of vaccination. In: Werner GH & Floch F (Editors), *The Pharmacology of Immunoregulation*. Academic Press, London, 123-139.
3. Biozzi G, Mouton D, Sant'Anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, Ferreira VCA, Heumann AM, Bouthillier Y, Ibanez OM, Stiffel C & Siqueira M (1979). Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 85: 31-98.
4. Adorini L & Doria G (1981). Defective antigen presentation by macrophage from mice genetically selected for low antibody response. *European Journal of Immunology*, 11: 984-989.
5. Biozzi G, Mouton D, Stiffel C & Bouthillier Y (1984). A major role of the macrophage in quantitative genetic regulation of immunoresponsiveness and anti-infectious immunity. *Advances in Immunology*, 36: 189-233.
6. Tzipori S (1983). Cryptosporidiosis in man, domestic animals, and humans. *Microbiological Reviews*, 47: 84-96.
7. Crawford FG & Vermund SH (1988). Human cryptosporidiosis. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 16: 113-159.
8. Current WL & Bick PH (1989). Immunobiology of *Cryptosporidium* spp. *Pathology and Immunopathology Research*, 8: 141-160.
9. Marcial MA & Madara JL (1986). *Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. *Gastroenterology*, 90: 583-594.
10. Arrowood MJ & Sterling CR (1987). Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *Journal of Parasitology*, 73: 314-319.
11. Lowry OH, Rosebrogh NNJ, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
12. Ma P & Soave R (1983). Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, 147: 824-828.
13. Ungar BLP, Soave R, Fayer R & Nash TE (1986). Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *Journal of Infectious Diseases*, 153: 570-578.
14. Cavalli-Sforza LL & Bodmer WF (1971). Quantitative characters of polygenic inheritance and environmental interactions. In: Kennedy D & Park RB (Editors), *The Genetics of Human Populations*. Freeman and Company, San Francisco, 508-633.
15. Sant'Anna OA, Mouton D, Ibanez OM, Bouthillier Y, Mevel JC, Reis MH & Biozzi G (1985). Basal immunoglobulin serum concentration and isotype distribution in relation to the polygenic control of antibody responsiveness in mice. *Immunogenetics*, 22: 131-139.
16. Sant'Anna OA, Bouthillier Y, Mevel JC, de Franco M & Mouton D (1991). Isotypic distribution of antibody responses in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24: 407-416.
17. Taghi-Kilani R, Sekla L & Hayglass KT (1990). The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. infection (studies with B cell-depleted mice). *Journal of Immunology*, 145: 1571-1576.