

## PARÂMETROS CLÍNICOS DE CAMUNDONGOS SWISS E BALB/C COMO MÉTODO DE ESCOLHA DE MODELO EXPERIMENTAL NO ESTUDO DA GIARDÍASE

Juliana Miki Nakanishi (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Liara Izabela Lopes Romera (Mestranda/PCS-Uem), Renata Coltro Bezagio (Doutoranda/PCS-Uem), Caroline Rodrigues de Almeida (Doutoranda/PCS-Uem), Cristiane Maria Colli (Docente/DBS-Uem), Mônica Lúcia Gomes (Orientadora), e-mail: monicaluciagomes@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Ciências Biológicas / Parasitologia / Protozoologia Parasitária Humana**

**Palavras-chave:** Giardíase, Modelo experimental, Murino

### Resumo:

O objetivo desse trabalho foi avaliar parâmetros parasitológicos e comportamentais de duas linhagens (Swiss e Balb/c) como método de escolha de modelo experimental murino para estudo da giardíase humana. Dez camundongos de cada linhagem e sexo foram divididos em grupos experimentais de cinco animais cada. O experimento ocorreu em duplicata e em momentos distintos para cada linhagem animal. A detecção de infecção pré-existente por *Giardia muris* foi realizada pelo método de Ritchie modificado com quantificação em câmara Neubauer e pela PCR com visualização em gel de poliacrilamida. O comportamento dos animais foi analisado com auxílio do software X-plo Rat. Os camundongos Swiss estavam naturalmente infectados com *G. muris* com eliminação média de  $1 \times 10^6$  cistos/g de fezes para os machos e  $7,8 \times 10^5$  cistos/g de fezes para as fêmeas, e foi possível visualizar bandas de 470 pb amplificadas pela PCR, o que pode interferir na fisiologia e resposta imune do animal. Os Balb/c apresentaram microscopia negativa e ausência de produtos de amplificação pela PCR. A análise do comportamento animal mostrou uma maior frequência de deslocamento dos camundongos Balb/c em relação ao Swiss para ambos sexos com diferenças significativas entre eles ( $p < 0,05$ ) sugerindo maior agitação que pode interferir na sua manipulação durante o período de experimentação. De acordo com os parâmetros avaliados o modelo experimental mais adequado para o estudo da giardíase humana são os camundongos Balb/c visto que chegam do biotério livres de infecção pré-existente por *G. muris*.

### Introdução

O agente etiológico da giardíase, *Giardia* spp., é o protozoário mais comumente encontrado no intestino delgado do homem e outros animais domésticos e selvagens. Pode causar, em animais jovens, diarreia intermitente com comprometimento da digestão e absorção de alimentos, acarretando desidratação,

perda de peso e morte (SILVA et al., 2008). O potencial zoonótico desse parasito tem despertado interesse e alavancado o surgimento de novas pesquisas.

Frequentemente, a maioria dos animais advindos de biotérios encontra-se naturalmente infectados por diversos patógenos como fungos, bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Entre os protozoários, *Giardia muris* é o mais frequente, podendo causar resposta inflamatória da mucosa intestinal com aumento da produção de muco e alterações na resposta imunológica do animal. Alterações nos sinais clínicos também podem ocorrer e interferir diretamente nos resultados (BEZAGIO et al., 2017).

É importante que os animais de bioexperimentação, utilizados como modelos para estudo de diversas patologias humanas, estejam livres de infecções pré-existentes (MAJEROWICZ, 2005). Por isso, faz-se necessário saber previamente se há ausência de infecção nestes animais ou se na presença de alguma infecção há alterações de parâmetros clínicos que podem interferir na confiabilidade dos resultados obtidos.

Em relação a giardíase, ainda não se tem clareza quanto ao melhor modelo experimental murino para o estudo dessa patologia. Muitos roedores ainda são utilizados na pesquisa desse patógeno, como camundongos, ratos, hamsters e gerbils (SILVA et al., 2008). Por isso, faz-se necessário ampliar os estudos a respeito dos animais de bioexperimentação, realizando a avaliação de alguns parâmetros, como a presença de parasitoses pré-existentes, detecção e quantificação desses parasitos, sexo e comportamento dos animais frente a essa infecção, como método para escolha do modelo experimental no estudo da giardíase. O objetivo do trabalho foi avaliar parâmetros parasitológicos e comportamentais de duas linhagens como método de escolha de modelo experimental murino para estudo da giardíase humana.

## Materiais e métodos

**1. Manutenção dos animais** - Foram utilizados 20 camundongos Swiss e 20 camundongos Balb/c, sendo 10 machos e 10 fêmeas de cada linhagem, de 21 dias, sem diferença significativa no peso médio dos camundongos em cada grupo. Esses animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os grupos experimentais foram mantidos no biotério do Setor de Parasitologia Básica da UEM e alocados em gaiolas micro-ambientadas. Durante os experimentos os animais foram mantidos em temperatura controlada ( $22,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12 horas, com água filtrada/fervida e alimentação oferecida *ad libitum*. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá sob o protocolo nº 9375170816.

**2. Grupos experimentais** - Os camundongos foram distribuídos em oito grupos de cinco animais cada, de acordo com linhagem e sexo. O experimento foi realizado em dois momentos distintos: o primeiro para avaliação da linhagem Swiss (macho e fêmea) e o segundo para a avaliação da linhagem Balb/c (macho e fêmea).

**3. Análise coproparasitológica** - Foi processado um grama de fezes pelo método de Ritchie (ROCHA e COSTA, 2016) modificado, em que o formol foi substituído pela água destilada. Do sedimento resultante foi realizada quantificação dos cistos de

*Giardia muris* em câmara de Neubauer e extração do DNA. A quantificação foi feita em triplicata, e os resultados, obtidos pela média simples.

**4. Extração de DNA e amplificação do material extraído** - A extração do DNA foi realizada com a utilização do Kit comercial “PureLink PCR Purification®”, conforme as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi amplificado a partir dos iniciadores G18S2 e G18S3 que amplificaram um fragmento de 470 pb de *G. muris*.

**5. Visualização dos produtos amplificados** - Os produtos amplificados foram visualizados pela eletroforese em gel de poliacrilamida a 4,5% revelados com sais de prata.

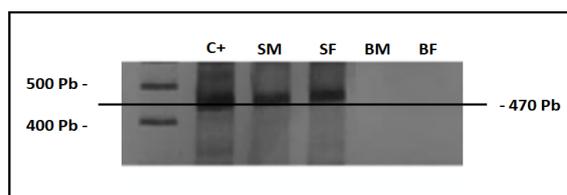
**6. Avaliação comportamental dos animais** – O comportamento de cada animal durante o teste “Open field circular” foi registrado durante o período de cinco minutos diários por 15 dias e analisado com auxílio do Software X-plo Rat em relação a frequência média de deslocamento do animal.

**7. Análise estatística** – Os dados dos experimentos comportamentais, foram analisados pelo método ANOVA de uma via, seguido dos testes de Dunnett t-test e Fisher, com nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

A média de cistos de *G. muris*, obtidos através da quantificação, para os camundongos Swiss foi de  $1 \times 10^6$  cistos/g de fezes para os machos e  $7,8 \times 10^5$  cistos/g de fezes para as fêmeas, sendo classificadas como amostras com alta carga parasitária de acordo com os parâmetros já descritos na literatura (PINTO et al.,1994). Não foram visualizados cistos de *G. muris* nas amostras de fezes dos camundongos Balb/c durante a microscopia, tanto para os machos como para as fêmeas.

A presença da banda de 470 pb no gel de poliacrilamida para as amostras dos quatro grupos dos camundongos Swiss confirmou a presença de *G. muris*. Nas amostras de fezes dos camundongos Balb/c, tanto machos como fêmeas, não foi visualizado produto amplificado da PCR, conforme a figura 1.



**Figura 1-** Presença do fragmento de 470 pb de *G. muris* em amostras de fezes de camundongos Swiss machos e fêmeas (SM e SF) e ausência em camundongos Balb/c machos e fêmeas (BM e BF).

Em relação aos parâmetros parasitológico e molecular observa-se que os camundongos Swiss vêm do biotério naturalmente infectados com *G. muris*, o que pode influenciar diretamente nos resultados da pesquisa, pois uma infecção pré-existente pode interferir na fisiologia, resposta imune e parâmetros clínicos dos animais (BEZAGIO et al., 2017). Estudos de susceptibilidade dos camundongos Balb/c a infecção por *Giardia* sp. são importantes e interessantes, visto que estes animais tiveram a mesma procedência dos camundongos Swiss.

A análise comportamental por meio do *Software X-Plo-Rat* demonstrou uma frequência média de deslocamento animal de 50 campos em cinco minutos dos camundongos Balb/c machos, e 53 campos em cinco minutos para as fêmeas. Já para os camundongos Swiss a frequência média de deslocamento foi de 32 campos em cinco minutos para os machos e 34 campos em cinco minutos para as fêmeas. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao comportamento dos animais entre os diferentes sexos dentro da mesma linhagem, porém tanto para machos como para fêmeas quando comparadas as duas linhagens houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre elas. Foi possível observar uma maior frequência de deslocamento dos camundongos Balb/c, sugerindo que esses são mais agitados quando comparados aos Swiss, o que pode dificultar a manipulação dos animais durante o experimento.

## Conclusões

De acordo com os parâmetros avaliados o modelo experimental mais adequado para o estudo da giardíase humana são os camundongos Balb/c visto que chegam do biotério livres de infecção pré-existente por *G. muris*.

## Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq - FA – UEM

## Referências

BEZAGIO, R.C.; COLLI, C.M.; ROMERA, L.I.L.; FERREIRA É.C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L.; GOMES, M.L. Synergistic effects of fenbendazole and metronidazole against *Giardia muris* in Swiss mice naturally infected. **Parasitology Research**, v. 116, p. 939- 944, 2017.

MAJEROWICZ, J. **Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do Laboratório de Experimentação Animal (Laean) de Bio-Manguinhos**. 92f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos em parceria com Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

PINTO, R. M.; VICENTE, J. J.; NORONHA, D.; GONÇALVES, L.; GOMES, D. C. **Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.89, n.1, p.33-40, 1994.

ROCHA, M.O.; COSTA, A.O. Exame Parasitológico de Fezes. In: NEVES, D.P; MELO, A.L; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**, 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. v.56, p. 541- 554.

SILVA, A.S.; SILVA, M.K.; OLIVEIRA, C.B.; ZANETTE, R.A.; MONTEIRO, S.G. Eficácia de drogas contra *Giardia muris* em camundongos *Mus musculus* naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, p.175-178, 2008.