

SENSIBILIDADE COMPARATIVA DO GERBIL (*Meriones unguiculatus*) E DO CAMUNDONGO (*Mus musculus*) INOCULADOS COM OOCISTOS ESPORULADOS DE *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) DA CEPA VEG

Comparative sensibility of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) and the mouse (*Mus musculus*) inoculated with oocysts sporulated of *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909)

FRAZÃO-TEIXEIRA¹, E.; OLIVEIRA², F. C. R.; ALMEIDA, E. S. C.³ & TEIXEIRA⁴, W. L.

(1) Bolsista PIBIC/CNPq, Laboratório de Sanidade Animal (LSA), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) E-mail: frazao-teixeira@bol.com.br; (2) Prof. Associado, LSA/CCTA/UENF, E-mail: foliveira@uenf.br.; (3) Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR), Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB/UENF); (4) Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

SUMMARY: Mice and gerbils were experimentally infected with sporulated oocysts of *Toxoplasma gondii* by oral and intraperitoneal. Results were obtained by serologic evaluation in mice and imprinting, histopathology and peritoneal washing in gerbils. According to observed data, gerbil and mouse were susceptible to the parasite, and both were more susceptible to oral inoculation. Gerbils were more sensible to both via of infection in comparison with mice.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, oocyst, gerbil, mouse, susceptibility, VEG strain.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de grande importância, tanto em medicina veterinária como humana. Seu agente etiológico é o *Toxoplasma gondii*, cujos hospedeiros definitivos são felídeos (FRENKEL *et al.*, 1970; MILLER *et al.*, 1972). É uma doença cosmopolita (SANTOS *et al.*, 1968), podendo assumir aspectos graves em casos congênitos e em indivíduos adultos imunodeprimidos (DUBEY, 1986).

Alta soroprevalência foi detectada em 865 felídeos silvestres em zoológicos de 20 estados brasileiros, caracterizando uma exposição generalizada destes animais ao parasita (RAMOS-SILVA *et al.*, 2001). Em outro estudo, 38% das raposas analisadas na Suécia tiveram anticorpos para *T. gondii* (JAKUBEK *et al.*, 2001). Foram também observados níveis elevados de transmissão congênita em cordeiros comerciais na Inglaterra (DUCANSON *et al.*, 2001). Estes dados caracterizam a importância deste parasita em animais de produção e, também, animais selvagens.

No hospedeiro intermediário, o *T. gondii* ocorre sob duas formas: uma de multiplicação rápida (taquizoítas) e outra lenta

(bradizoítas) contida em cistos. As formas proliferativas são as formas prevalentes na fase aguda da doença, onde ocorrem os maiores danos nos tecidos do hospedeiro. Sob a ação do sistema imune, o *T. gondii* pode encistar-se em qualquer órgão ou músculos do animal, sem que haja reação tecidual local. Em indivíduos imunossuprimidos, é comum a reativação de cistos teciduais, responsáveis pela reagudização da doença (LUFT & REMINGTON, 1985). Geralmente, a reativação de cistos localizados no sistema nervoso central pode causar retinocoroidite e meningoencefalite.

Eliminados juntamente com as fezes, os oocistos precisam esporular para se tornarem infectivos, contaminando o ambiente e mantendo essa infectividade durante meses (YILMAZ & HOPKINS *et al.*, 1972). Estes são oriundos da fase sexuada do parasita no epitélio intestinal dos felídeos. As principais formas de infecção ocorrem pela ingestão de carne com cistos e alimentos ou água contaminados com oocistos (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O camundongo é muito utilizado como modelo experimental em toxoplasmose, tendo demonstrado inúmeros atributos físicos e biológicos que concretizam sua viabilidade para estes fins. Já a utilização do gerbil ainda não é muito

difundida no meio científico, entretanto, esse animal é considerado um modelo experimental para vários estudos biológicos, devido às suas características físicas, metabólicas, psicossociais, bioquímicas e neurológicas (MARSTON, 1972; BURKE, 1979; TRAYHURN *et al.* 1984). Sua susceptibilidade ao *T. gondii* foi relatada (SUZUKI & TSUNEMATSU, 1974 e FUJII *et al.*, 1983), e é constantemente utilizado em estudos da leptospirose (YUKAWA *et al.* 1990; SONRIER *et al.* 2000). São resistentes a grandes amplitudes térmicas (MARSTON, 1972), com excelente aproveitamento hídrico.

Este trabalho visou comparar as sensibilidades destas duas espécies, camundongos e gerbis, ao *T. gondii* quando inoculados experimentalmente com oocistos esporulados da cepa VEG.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos e gerbis foram inoculados com oocistos esporulados de *T. gondii* da cepa VEG pelas vias oral (*v.o.*) e intraperitoneal (*i.p.*). Os oocistos foram gentilmente cedidos pelo Dr. J. P. Dubey, USDA, EUA.

Foram utilizados um total de 46 camundongos albinos CF1 e 28 gerbis, todos fêmeas. Os camundongos foram obtidos do biotério do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Os gerbis utilizados provieram de colônias mantidas pelo Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF.

Os camundongos foram distribuídos em gaiolas com grupos de dois animais cada, exceto aqueles animais inoculados com cinco oocistos. Estes foram alojados em gaiolas contendo três animais.

Os inóculos administrados aos camundongos infectados foram padronizados com cinco, 50, 10^2 , 5×10^2 , 10^3 e 5×10^3 oocistos esporulados. Dois animais foram inoculados com solução salina (NaCl a 0,9%) *v.o.* e outros dois *i.p.*, servindo, assim, como grupos controle. Para a administração do inóculo *v.o.* utilizou-se uma seringa de 2mL acoplada a uma sonda metálica. Desta forma, o inóculo foi depositado diretamente no compartimento gástrico dos animais. Nos animais infectados *i.p.* utilizaram-se agulhas de insulina acopladas às seringas.

Os gerbis, igualmente separados em grupos de dois animais, receberam inóculos padronizados contendo cinco, 15, 25, 35 e 50 oocistos esporulados de *T. gondii*. Aos gerbis inoculados *v.o.* foram administradas, também, as quantidades de 10^2 e 10^3 oocistos esporulados. Foram também separados quatro animais controle, sendo dois para cada via de inoculação. As inoculações foram realizadas da mesma forma que a feita nos camundongos.

Todos os animais foram acompanhados diariamente durante 35 dias após a inoculação (DAI), recebendo, neste período, ração própria para a espécie e água *ad libitum*.

Os camundongos foram avaliados sorologicamente para toxoplasmose. Para isso, foram coletadas amostras de sangue do plexo sub-orbital, utilizando-se pipetas Pasteur, sendo os soros submetidos ao teste ELISA, utilizando-se a técnica de rotina do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) da UENF. A avaliação dos gerbis foi feita através das técnicas de impressão dos órgãos em lâminas (decalque), histopatologia e observação de exsudato peritoneal ao microscópio óptico. Quando se observava nos animais abdômen distendido (peritonite) eram feitas lavagens peritoneais com solução salina, sendo os aspirados observados ao microscópio óptico para identificação de taquizoítas. Nos que morreram ou foram sacrificados realizou-se necropsia e retirada dos pulmões, fígado, baço, coração e cérebro para exames.

Os decalques foram fixados em metanol, corados com GIEMSA e observados sob aumento de 400x ao microscópio óptico. Para o exame histopatológico, as amostras dos tecidos foram fixadas em formol tamponado a 10%, incluídos em parafina, cortados em micrótomo e corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), sendo então observados sob aumento de 400x e 1000x ao microscópio óptico comum. Em ambas as técnicas, foram considerados positivos para toxoplasmose aqueles animais em cujos órgãos foram encontradas formas proliferativas e císticas do parasita.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais controle foram avaliados e considerados negativos para toxoplasmose. Nos camundongos isso ficou confirmado pela negatividade ao teste de ELISA. No caso dos gerbis, os animais controle não morreram e os infectados apresentaram formas evolutivas do parasita em seus órgãos ou exsudatos peritoneais.

A avaliação clínica dos camundongos infectados durante o período do experimento não caracterizou quaisquer sinais de infecção pelo *T. gondii*. Mas, em contrapartida, pela avaliação sorológica, ficou claro que os animais foram positivos para *T. gondii*, pois todos soroconverteram. Apenas um animal inoculado com 5×10^3 oocistos por *v.o.* morreu (Tabela 1).

Por outro lado, todos os gerbis inoculados vieram a óbito durante o período de observação, exceto aqueles inoculados com cinco oocistos *i.p.* Esses últimos foram diagnosticados através da presença das formas císticas do *T. gondii* em seus órgãos. Em todos os animais que morreram foi possível observar a presença dos taquizoítas nas impressões dos órgãos

Tabela 1: Camundongos e gerbis inoculados com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* (cepa VEG)

Nº de oocistos	Via de inoculação							
	Oral				Intraperitoneal			
	<i>Mus musculus</i>		<i>Meriones unguiculatus</i>		<i>Mus musculus</i>		<i>Meriones unguiculatus</i>	
	Morte	Resultado	Morte	Resultado	Morte	Resultado	Morte	Resultado
5	0	3/3 E ^b	2/2	2/2 I ^c	0	3/3 E	0	2/2 H ^d
15	N ^a	N	2/2	2/2 I	N	N	2/2	2/2 I
25	N	N	2/2	2/2 I/H	N	N	2/2	2/2 I
35	N	N	2/2	2/2 I	N	N	2/2	2/2 I/L ^e
50	0	2/2 E	2/2	2/2 I	0	2/2 E	2/2	2/2 I/L
100	0	2/2 E	2/2	2/2 I	0	2/2 E	N	N
500	0	2/2 E	N	N	0	2/2 E	N	N
1000	0	2/2 E	2/2	2/2 I	0	2/2 E	N	N
5000	1/2	2/2 E	N	N	0	2/2 E	N	N

^a Animais não avaliados.^b Positivos pelo teste de ELISA.^c Positivos para taquizoítas em impressão de órgãos.^d Positivos para formas císticas em cortes histológicos.^e Positivos para presença de taquizoítas em lavado peritoneal.

e histopatologia (Figura 1). Em alguns também foi observado *T. gondii* em lavado peritoneal (Tabela 1).

Pelos resultados observados, os camundongos foram pouco sensíveis à cepa do parasita utilizada. O mesmo não aconteceu com a espécie *M. unguiculatus*, cujo diagnóstico de toxoplasmose aguda foi evidenciada em todos os animais.

É importante enfatizar que os parasitas foram observados em todos os órgãos dos gerbis, concretizando ampla distri-

buição dos mesmos nos tecidos dos animais, exceto os que foram inoculados com cinco oocistos *i.p.* No entanto, estes tiveram parasitismo tecidual (Figura 1).

Observa-se na Figura 2 a evolução do percentual de mortalidade dos gerbis inoculados com cinco, 15, 25, 35 e 50 oocistos.

Os gerbis inoculados *v.o.* começaram a morrer a partir do quarto DAI. Já nos animais inoculados *i.p.* a morte ocorreu apenas a partir da terceira semana.

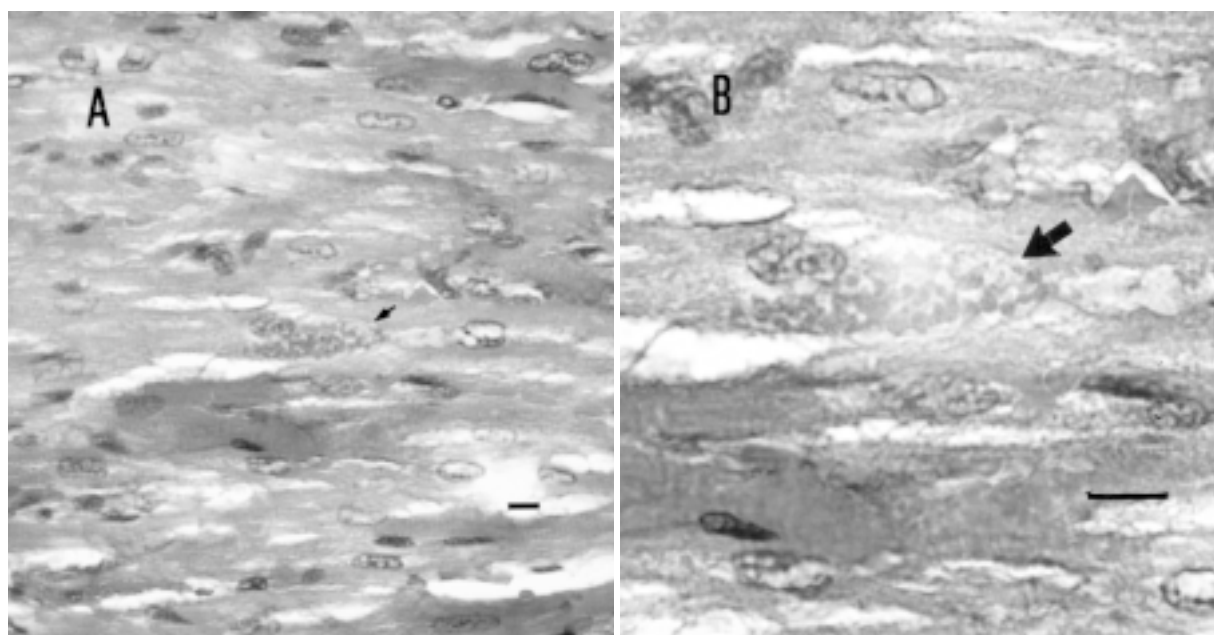


Figura 1: Corte histológico de músculo cardíaco de gerbil (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente com cinco oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii*. Em A cisto na fibra muscular (○) e em B detalhe do cisto contendo bradizoítas (→). Coloração HE. (— = 10 μm).

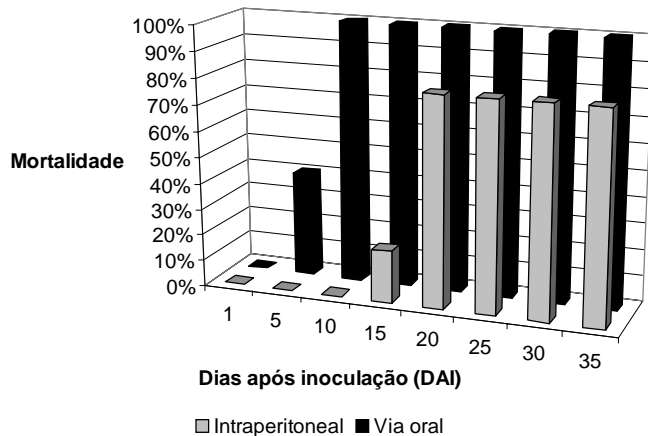


Figura 2: Mortalidade dos gerbis inoculados com cinco, 15, 25, 35 e 50 oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii*.

FUJII et al. (1983) relataram sensibilidade ao *T. gondii* tanto em *M. musculus* como em *M. unguiculatus*, sendo essa afirmação confirmada através dos dados aqui obtidos com a cepa VEG. Entretanto, estes autores afirmam que o gerbil é moderadamente sensível ao *T. gondii*, sendo o camundongo altamente sensível a este parasita. Ao contrário dos dados apresentados por esses autores, no presente trabalho de pesquisa observou-se grande sensibilidade dos gerbis, em comparação com os camundongos, frente à cepa VEG do *T. gondii*. Dados semelhantes obtidos previamente por SUZUKI & TSUNEMATSU (1974) relataram alta sensibilidade dos gerbis ao *T. gondii* quando inoculados cistos teciduais de *T. gondii* das cepas Beverley e YH.

Mesmo já tendo sido relatada por outros autores, a sensibilidade dos gerbis aqui apresentada simula uma situação real de infecção desta espécie. Isso porque o oocisto esporulado é a via mais provável de infecção nesses animais.

Assim, infere-se que ambas as espécies podem ser utilizadas no estudo da zoonose em pauta, ressaltando-se que os gerbis tiveram uma sensibilidade muito mais acentuada em relação aos camundongos. Desta forma, podem ser considerados um excelente modelo experimental, tendo em vista as suas características físicas, metabólicas, psicossociais, bioquímicas e neurológicas observadas por MARSTON, (1972); BURKE, (1979) e TRAYHURN & DOUGLAS (1984).

Ambas as espécies foram mais sensíveis pela v.o. de inoculação. Isso pôde ser comprovado pelo fato do único camundongo que morreu ter sido inoculado por essa via. Como adjuvante, percebeu-se que os gerbis com reações patológicas mais evidentes em seus tecidos foram os inoculados v.o. e que os únicos que não morreram foram inoculados i.p.

A considerável divergência entre as respostas fisiológicas das duas espécies torna justificável um estudo comparativo como este. A hipótese de que o gerbil possa ser um mode-

lo experimental compatível, e até mais plausível que o camundongo, fica evidenciada neste trabalho. As concentrações de oocistos que fizeram com que os gerbis morressem foram menores, enquanto que os camundongos precisaram de uma quantidade 100 vezes maior para causar uma resposta de proporções aproximadas. Isso só reafirma a susceptibilidade dos gerbis ao *T. gondii*, demonstrando adequação aos padrões de estudo da biologia do parasita e dos aspectos clínicos da toxoplasmose, principalmente em casos agudos da doença.

As quantidades de 10^2 , 5×10^2 , 10^3 e 5×10^3 oocistos dadas aos camundongos tornaram-se um excepcional meio de comparação entre a baixa sensibilidade destes e a alta sensibilidade dos gerbis. Avaliando os dados da Figura 2, percebe-se que os gerbis tiveram uma fase aguda da doença bastante evidente. Estes dados, em conjunto com os apresentados na tabela 1, nos permite concluir que há maior resistência dos camundongos à infecção, mesmo naqueles inoculados com até 5×10^2 oocistos i.p. Reforça ainda estas informações o fato dos camundongos não terem apresentado sinais clínicos da doença em qualquer período do experimento.

Por fim, fica confirmada a susceptibilidade da espécie *M. musculus* à cepa VEG do *T. gondii*, por outro lado, justifica-se o uso do gerbil como modelo experimental para o estudo da forma aguda da toxoplasmose, dada a sua maior sensibilidade em relação ao camundongo albino CF1.

SUMÁRIO

Camundongos e gerbis foram infectados experimentalmente com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii*. Os resultados foram obtidos através da avaliação sorológica nos camundongos e por decalque, histopatologia e lavagem peritoneal nos gerbis. De acordo com os dados observados, verificou-se que tanto os camundongos como os gerbis foram susceptíveis ao parasita, sendo ambos mais sensíveis pela via oral. Os gerbis foram mais sensíveis que os camundongos em ambas as vias de inoculação.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, oocisto, gerbil, camundongo, susceptibilidade, cepa VEG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURKE, T. J. (1979). Rats, mice, hamsters and gerbils. Symposium on non-domestic pet medicine. *The Veterinary Clinics Of North America. Small Animal Practice*, 9: 473-86.
- DUBEY, J. P. (1986). Toxoplasmosis. *American Journal Of Veterinary Medicine*, 189: 166-79.

- DUNCANSON, P.; TERRY, R. S.; SMITH, J. E.; HIDE, G. (2001). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *International Journal for Parasitology*, 31: 1699-703.
- FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167: 893-6.
- FUJII, H.; KAMIYAMA, T.; HAGIWARA, T. (1983). Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma gondii* among laboratory rodents. *Japanese Journal Of Medical Science And Biology*, 36: 343-6.
- JAKUBEK, E.-B.; BRÖJER, C.; REGNERSEN, C.; UGGLA, A.; SCHARES, G.; BJÖRKMAN, C. (2001). *Veterinary Parasitology*, 102: 167-172.
7. LUFT & REMINGTON (1985). Toxoplasmosis of the central nervous system. In: REMINGTON, J. S. e SWATZ, M. N. *Current Clinical Topics in Infection Diseases*, 6: 315-58.
- MARSTON, J. H. (1972). The Mongolian gerbil. In: HUME, C. W. *The UFAW handbook on the care and manegement of laboratory animals. Fourth Edition.*, cap. 21: 257-267.
- MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. (1972). Oral infections with toxoplasma cysts and oocysts in felines, other animals and birds. *Journal of Parasitology*, 58: 928-37.
- OLIVEIRA, F. C. R.; COSTA, A. J.; BECHARA, G. H.; SABATINI, G. A. (2001). Distribuição e viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) em tecidos de *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* infectados com oocistos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 23: 28-34.
- RAMOS-SILVA, J. C.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C. H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; FERREIRA-NETO, J. S. (2001). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 102: 217-24.
- SANTOS, J. A.; NOVLOSKI, G.; PEREIRA, F. F. C.; RESENDE, A. M. L. (1968). Estudos sobre a incidência e as lesões histopatológicas da toxoplasmose em mamíferos domésticos (cães e coelhos no Brasil). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 3: 275-83.
- SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVDËN-CLOUET, N.; GANIÈRE, J. P.; ANDRÉ-FONTAINE, G. (2001). Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine*, 19: 86-94.
- SUZUKI, M.; TSUNEMATSU, Y. (1974). Susceptibility of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867) to *Toxoplasma* infection. *Annals of Tropical and Parasitology*. 68: 33-9.
- TRAYHURN, P. & DOUGLAS, J. B. (1984). Fatty acid synthesis in brown adipose tissue of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*); influence of acclimation temperature on synthesis in brown adipose tissue and the liver in relation to whole-body synthesis. *Comparative Biochemistry And Physiology*, 78B: 601-7.
- YILMAZ, M. S. & HOPKINS, S. H. (1972). Effects of different conditions on duration of infectivity on *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Parasitology*, 58: 938-9.
17. YUKAWA, M.; MOCHIZUKI, K.; IMAMURA, S. (1990). Suscetibility of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) to leptospire and the protective effect of vaccination. *Veterinary Microbiology*, 24: 63-71.