



EFICÁCIA DE FÁRMACOS CONTRA *Giardia muris* EM CAMUNDONGOS SWISS NATURALMENTE INFECTADOS

EFFECTIVENESS OF DRUGS AGAINST *Giardia muris* in SWISS MICE NATURALLY INFECTED

Mariana Felgueira Pavanelli^{1,2}

Tatiane Izaura Garcia¹

Cristiane Maria Colli²

¹Faculdade Integrado de Campo Mourão, Campo Mourão – PR

²Universidade Estadual de Maringá / UEM, Maringá - PR

²Universidade Estadual de Maringá-PR

Artigo
Completo

RESUMO

A utilização de animais de laboratório é extremamente relevante para o desenvolvimento de pesquisas científicas em áreas como ciências biológicas e da saúde. Para que os resultados experimentais sejam confiáveis é necessário que o animal esteja em homeostase fisiológica, livre de infecções microbianas. *Giardia muris* é um protozoário frequentemente presente em roedores provenientes de biotérios. O objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar a taxa de eficácia dos fármacos antiparasitários contra *Giardia muris*. Foram utilizados camundongos Swiss com giardíase murina, detectada por meio da técnica de centrífugo-flutuação. Estes animais foram tratados com 4 mg/ml de albendazol, metronidazol, secnidazol, febendazol e nitazoxanida, por cinco dias consecutivos. Os fármacos albendazol, febendazol e nitazoxanida apresentaram 100% de eficiência. A eficácia da terapia com metronidazol e secnidazol foi insatisfatória, 82,9% e 38% respectivamente. Albendazol, febendazol e nitazoxanida são eficientes na erradicação de *Giardia muris*, entretanto são necessários novos estudos para estabelecer dosagens seguras e eficazes a fim de auxiliar na padronização de protocolos terapêuticos para a giardíase murina.

Palavras chave: antiparasitários; animais de laboratório; albendazol.

ABSTRACT

The use of laboratory animals is extremely important for the development of scientific research in areas such as biology and health. For the experimental results are reliable is necessary that the animal be in physiological homeostasis free from microbial infections. *Giardia muris* is a protozoan who often is present in rodents from vivarium. Objective Evaluating and comparing the efficacy rate of antiparasitic drugs against *Giardia muris*. For the experiment were used Swiss mice who presented murine giardiasis detected by the technique flotation. These animals were treated with 4 mg/ml of albendazole, metronidazole, secnidazol, febendazol and nitazoxanide by five consecutive days. The drugs Albendazole, febendazole and Nitazoxanide showed 100 % efficiency. However, the efficacy of therapy with metronidazole and secnidazol was unsatisfactory, 82.9 % and 38% respectively. Albendazole, febendazole and nitazoxanide are effective in eradicating *Giardia muris*, however, are necessary further studies to establish safe and effective dosages in order to assist the therapeutic standardization of protocols for the murine giardiasis

Key Words: antiparasitic; laboratory animals; albendazole.

INTRODUÇÃO

A utilização de animais de laboratório é extremamente relevante para o desenvolvimento de pesquisas científicas em áreas como ciências biológicas e da saúde (BRAGGIO et al., 2003; ALVES et al., 2007; BICALHO et al., 2007; CHORILLI et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008; BRANCO et al., 2011). Animais de várias espécies têm sido empregados nas pesquisas, sendo os roedores os mais utilizados (CHORILLI et al., 2007).

Para que os resultados experimentais sejam confiáveis é necessário que a cobaia esteja em homeostase fisiológica e, para que esse equilíbrio aconteça são necessárias medidas que proporcionem o bem estar animal, como cuidados com a condição ambiental (BRAGGIO et al., 2003; ALVES et al., 2007; BICALHO et al., 2007; MEDEIROS, et al., 2008).

Entretanto, mesmo que os cuidados necessários sejam empregados, pode haver infecção microbiana direta ou por meio de fômites contaminados. Dentre os microrganismos, os maiores responsáveis por infecções em biotérios são os enteroparasitos, especialmente *Giardia muris*. Muitas vezes o animal infectado não apresenta sintomas, o que favorece a disseminação parasitária (DOYLE et al., 2006; ALVES et al. 2007; BICALHO et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008; SILVA et al., 2008).

A giardíase murina é causada pelo protozoário flagelado *Giardia muris*, este parasita pode causar manifestações intestinais, acompanhada de alterações enzimáticas, o que pode vir a prejudicar indiretamente pesquisas envolvidas a fenômenos de reposta inflamatória, aumentando a contagem de leucócitos e distúrbios nas dosagens de citocinas e oxido nítrico. Além disto, a infecção pode desencadear mudanças ultraestruturais no intestino delgado, dificultando assim estudos histológicos deste órgão (ECKMANN et al., 2000; ALVES et al., 2007)

Por isso é de extrema relevância que os animais bioexperimentais estejam livres de infecções. Sendo assim, o tratamento medicamentoso muitas vezes é necessário. Os estudos voltados ao tratamento de giardíase murina são escassos, e não há uma padronização com relação aos métodos e medicamentos utilizados na erradicação da *Giardia muris*. Portanto, nosso objetivo foi avaliar e comparar a taxa de eficácia de cinco fármacos antiparasitários para o tratamento da giardíase murina.

MATERIAL E MÉTODOS

Declaração de ética e Animais:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade Integrado de Campo Mourão - PR sob o protocolo nº 666.

Foram utilizados 36 camundongos Swiss, machos, com 21 dias de idade, naturalmente infectados com *Giardia muris*. Todos os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade Integrado de Campo Mourão, PR., em ambiente climatizado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, ração e água *ad libitum* e em caixas plásticas de fundo telado, para evitar o contato com as fezes e possíveis reinfecções durante o experimento. O período de aclimação de sete dias foi respeitado previamente ao início do experimento.

Diagnóstico da giardíase murina:

Para o diagnóstico da giardíase murina foram realizados em todos os animais exames parasitológicos de fezes pela técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco (FAUST et al., 1938). Como o gene glutamato desidrogenase (GDH) é específico para *Giardia duodenalis*, este foi utilizado para exclusão da presença desta espécie. Tal gene foi amplificado em reação de seminested PCR (CACCIÓ et al., 2008).

Tratamento e avaliação da eficácia:

Os camundongos foram distribuídos em seis grupos (A, B, C, D, E e F), contendo 6 animais cada. Os grupos A, B, C D e E foram os grupos tratados com albendazol, metronidazol, secnidazol, febendazol e nitazoxanida, respectivamente. Os fármacos foram diluídas em 600 mL de água filtrada ficando na concentração final de 4 mg/ml que substituíram, por cinco dias, a água oferecida no período de aclimação. Os roedores do Grupo F não foram submetidos à terapia antiparasitária, em função disso o grupo foi classificado como controle para monitoração da eficácia e parâmetros clínicos (SILVA et al., 2008).

Para avaliar a eficácia do tratamento foram realizados dois exames parasitológicos de fezes, um antes (dia zero) e outro dez dias após o início do tratamento, segundo Silva et al. (2008). A avaliação da carga parasitária foi baseada na classificação de Pinto et al. (1994), a qual se considera infecção leve quando são visualizados de 1 a 100 cistos/lâmina, moderada de 101 a 300 cistos/lâmina e infecção elevada quando estão presentes mais de 301 cistos/lâmina. Para realização do cálculo de eficácia do antiparasitário foi utilizada a fórmula descrita por Coles et al. (1992):

$$\% \text{ Eficácia} = (\text{Média do nº de cistos do grupo controle} - \text{Média do nº de cistos do grupo tratado}) \times 100 / \text{Média do nº de cistos do grupo controle}$$

Parâmetros clínico/fisiológicos avaliados:

Os parâmetros clínicos e fisiológicos foram avaliados no primeiro e décimo dia de experimento. A temperatura corpórea foi aferida com um termômetro digital de infravermelho posicionado no dorso do animal (FALKOWSKI et al., 2012). A escolha por este tipo de instrumento torna a avaliação clínica mais fácil e tem como objetivo minimizar o estresse sofrido pelos animais (WARN et al., 2003), pois este pode causar alterações fisiológicas, interferindo nos

resultados. Os animais foram pesados utilizando uma balança semianalítica.

Para a avaliação da ingesta de ração, esta foi pesada no primeiro e último dia de experimento, e foi calculada a quantidade em gramas/dia que cada camundongo consumiu, sendo considerada uma perda por esfarelamento de 10% para todos os grupos (CARVALHO et al., 2003). A ingesta do medicamento foi avaliada medindo a quantidade restante de água ao final do experimento.

Análise estatística:

Os valores de média e erro padrão foram utilizados para comparação dos dados por meio dos testes de ANOVA, Tukey e teste "t" de student com auxílio do *software* GraphPad Prism® versão 3.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início do experimento, antes do tratamento, todos os animais estavam parasitados por *Giardia muris*, sendo a infecção classificada como leve, não havendo diferença significativa entre os grupos (PINTO et al., 1994). A baixa carga parasitária encontrada nas cobaias pode ter contribuído para a ausência de sinais clínicos.

O consumo de albendazol foi superior a todos os outros fármacos, já os medicamentos nitroimidazólicos, como secnidazol e metronidazol foram menos consumidos (Figura 1). Entretanto, a diferença entre o consumo de cada grupo não foi significativa ($p > 0,05$).

O albendazol, com sabor de laranja, por exemplo, foi o fármaco que teve o maior consumo (sem causar sobredosagem), possivelmente porque o flavorizante mascarou o gosto do fármaco, o que aumentou a aceitação pelos animais. Já o metronidazol e o secnidazol por apresentar um gosto metálico desagradável foram ingeridos em menor quantidade pelos camundongos. Em função da rejeição ao metronidazol pelos animais, o tratamento do

referido grupo teve que ser interrompido no terceiro dia de experimento. É relevante ressaltar que não foram encontradas formulações de metronidazol e secnidazol com flavorizantes, justificando seu uso no experimento.

Após o tratamento medicamentoso notou-se a diminuição do número de cistos

eliminados para todos os grupos. Por meio da fórmula descrita anteriormente, pode-se verificar eficácia de 100% para os fármacos albendazol, febendazol e nitazoxanida. O metronidazol e o secnidazol apresentaram taxa de eficácia de 82,9% e 38%, respectivamente. A quantidade de cistos antes e após a terapia pode ser visualizada na Tabela 1.

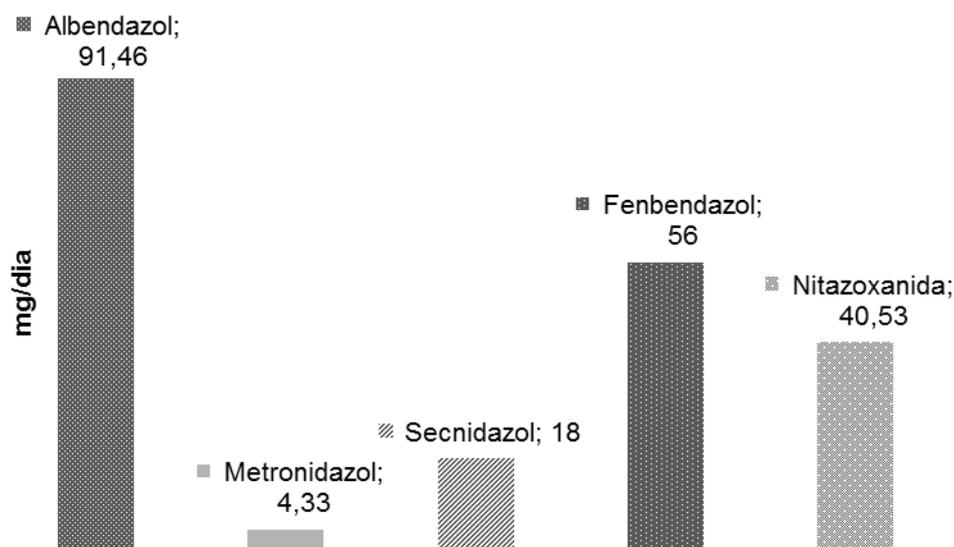


Figura 1. Consumo de medicamentos (mg/dia) ao final do experimento para cada grupo experimental.

Todos os fármacos apresentaram redução ou erradicação no número de cistos de *Giardia muris*, o secnidazol não apresentou 100% de eficiência e, a efetividade do metronidazol não pode ser mensurada uma vez que o tratamento foi interrompido antes do tempo ideal. Cimerman et al. (1998), em um estudo realizado em humanos, utilizou metronidazol na dose de 250 mg duas vezes ao dia durante 5 dias, a eficácia do fármaco na população do estudo foi de 91,2%. Silva et al. (2008) utilizando camundongos e medicação diluída em água, observaram taxas de cura para secnidazol de 100%, seguido por 97% para o metronidazol. Estes valores discrepantes ao obtido no presente estudo podem ser explicados pela rejeição ao secnidazol e metronidazol, além do que, para este último medicamento o tratamento durou três dias,

consequentemente a concentração do fármaco ingerida durante o tratamento foi baixa.

Em um estudo de toxicidade em ratos, foram encontrados isolados considerados clinicamente resistentes ao metronidazol, já que as cepas de *Giardia spp.* exibiram uma Dose Letal 50 (DL50) > 120 mg/kg (LEMÉE et al., 2000). O metronidazol na concentração de 20 mg/mL e secnidazol a 0,8 mg/mL administrados em dose única apresentaram porcentagens de cura de 58,3% e 40%, respectivamente (CRUZ et al., 1997). Desta forma, é possível observar que a concentração dos fármacos e/ou tempo de tratamento incorretos implicam no insucesso terapêutico.

Tabela 1. Média do número de cistos para cada grupo experimental antes e após a terapia antiparasitária.

Grupo/terapia	Média do nº de cistos ± EPM*	
	Antes do tratamento	Após o tratamento
Albendazol	34,0 ± 27,8	0,0 ± 0,0
Metronidazol	3,5 ± 1,9	0,6 ± 0,6
Secnidazol	14,7 ± 10,6	2,2 ± 1,4
Febendazol	4,7 ± 1,8	0,0 ± 0,0
Nitazoxanida	133,2 ± 115,9	0,0 ± 0,0

*EPM: Erro Padrão da Média

Os demais fármacos testados no presente estudo apresentaram 100% de taxa de cura. A eficiência do albendazol contra *Giardia* spp. foi relatada por Cruz et al. (1997) como superior ao metronidazol para cobaias, além de apresentar ação contra helmintos. A avaliação *in vitro* mostra que o albendazol pode ser de 30 a 50 vezes mais eficiente que o metronidazol (EDLIND et al., 1990). A nitazoxanida, por sua vez, é citada como opção de tratamento em casos de resistência a albendazol e metronidazol na giardíase em humanos imunossuprimidos (ABBOUD et al., 2001). Silva et al. (2008), observaram taxa de cura em camundongos superior a 98,3% no uso do febendazol.

Os camundongos tratados com metronidazol, secnidazol e febendazol consumiram mais ração (12 g/dia), já aqueles pertencentes aos grupos albendazol e nitazoxanida tiveram um consumo de ração semelhante ao grupo controle (8 g/dia). A diferença entre o consumo de ração pelos animais dos diferentes grupos não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Com relação ao peso dos animais não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os animais dos grupos tratados e não tratados, apesar dos animais tratados terem perdido peso e aqueles não tratados (grupo controle) ganharem peso ao final do experimento. A contaminação por *Giardia* spp. pode diminuir a absorção de água e nutrientes, provocando desidratação e perda de peso (SILVA et al., 2008). Neste estudo, mesmo os animais estando curados, notou-se uma diminuição no peso dos

camundongos submetidos à terapia antiparasitária e aumento de peso naqueles não tratados, desta forma é possível inferir que a infecção ocasionada por *Giardia muris* não teve influência sobre a redução de peso dos animais neste estudo. O consumo de ração também não alterou o peso dos animais, o que indica que a terapia medicamentosa possa ter interferido no crescimento dos mesmos.

A temperatura corporal dos camundongos no primeiro dia do experimento encontrava-se entre 33,9°C e 34,7°C. Após o tratamento houve redução da temperatura em todos os grupos, incluindo o controle, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos.

O método proposto por Silva et al. (2008), e realizado neste estudo, possui como vantagem a facilidade de tratamento, o manuseio dos animais é menor, o que diminui o estresse sofrido pelos roedores. Além disto, o medicamento diluído e exposto ao consumo dos camundongos aumenta a adesão do tratamento. A técnica de gavagem, na qual o medicamento é introduzido no esôfago do animal, tem como vantagem a possibilidade de padronização de doses e a diminuição de interferências experimentais por influência do gosto do fármaco, entretanto, esta é uma técnica invasiva que implica no aumento do estresse sofrido pelos animais e requer que o pesquisador tenha que comparecer ao biotério no mínimo uma vez ao dia de acordo com a posologia do medicamento.

CONCLUSÕES

A estratégia de tratamento utilizando os medicamentos albendazol, febendazol e nitazoxanida diluídos em bebedouro, apresentou 100% de eficiência no tratamento, o que torna estes fármacos uma boa escolha para erradicação de *Giardia muris* em camundongos. A eficácia do metronidazol não pôde ser estimada em função da interrupção da terapia.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, P.; LEMÉE, V.; GARGALA, G.; et al. Success ful treatment of Metronidazol and Albendazole resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford, v.32, pg.1792-1794, 2001.
- ALVES, L. C.; BORGES, C.C.A.; SILVA, S.da; et al. Endoparasitos em cobaias (*Cavia porcellus*) (Mammalia, Rodentia, Caviidae) provenientes de biotérios de criação e experimentação do município do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1380-1386, 2007.
- BICALHO, K. A.; ARAÚJO, F.T.M.; ROCHA,R.S.; et al. Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I - endo and ectoparasites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.6, p.1478-1484, 2007
- BRAGGIO, M.M.; MARTINS, A.R.S.; VALERO, V.B. Influência do manejo na produtividade e no desenvolvimento de camundongos (*Mus musculus*). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.149-153, 2003
- BRANCO, A.C.S.C.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N.de; et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciência da Saúde**, João Pessoa, v.15, n.2, p.209-214, 2011.
- CACCIÓ, S.M.; BECK, R.; LALLE, M.; et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.1523-1531, 2008.
- CARVALHO, R.A.; CARVALHO, S.A.; MOURÃO, F.R.P.; et al. Avaliação Nutricional de ração comercial para camundongos. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v.17, p.22-28, 2003,
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciência Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v.28, n.1, p.11-23, 2007.
- CIMERMAN, B.; BORUCHOVSKI, H.; CURY, F.M.; et al. Estudo comparativo entre secnidazol e metronidazol no tratamento da giardíase. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v.62, n.4, p. 291-294, 1988.
- COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; et al.; World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, p.44, n.1-2, p.35-44, 1992.
- CRUZ, C.C.P.; FERRARI, L.; SOGAYAR, R. Ensaio terapeutico na infecção por *Giardia muris* em camundongos com metronidazole, tinidazole, secnidazole e furazolidone. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.3, p.223-228, 1997.
- DOYLE, R.L.; MONTEIRO, S.G.; GRAÇA, D.L.; et al. Avaliação helmintológica de camundongos (*Mus musculus*) criados em biotérios experimental. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.13, n.2, p.108-115, 2006.

- ECKMANN, L.; LAURENT, F.; LANGFORD, T.D.; et al. Nitric oxide production by human Intestinal epithelial cells and competition for arginine as potencial determinants of host defense against the lumen- dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **The Journal of Immunology**, San Diego, v.164, n.3, p.1478-87, 2000.
- EDLIND, T. D.; HANG, T.L.; CHAKRABORTY, P.R. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. **Journal of Infectious Diseases**. V. 162, p.1408-1411, 1990.
- FALKOWSKI, G.J.S.; SANDRI, P.F.; TIYO, R.; et al. Parameters for evaluation of clinical trial in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.64, n.6, p.1539-1546, 2012.
- FAUST, E.C.; D'ANTONI, J.S.; ODOM, V.; et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.18, p.169-178, 1938.
- LEMÉE, V.; ZAHARIA, I.; NEVEZ, G.; et al. Metronidazole and albendazol susceptibility of 11 clinical isotes of *Giardia duodenalis* from France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.46, p.819-821, 2000.
- MEDEIROS, S.H.L.; TELMO, P.L.; AGUIAR, P.S.; et al. A importância dos biotérios na pesquisa experimental. **Vittale**, Rio Grande, v.20, n.1, p. 25-29, 2008.
- PINTO, R. M.; VICENTE, J.J.; NORONHA, D.; et al. Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, n.1, p.33-40, 1994.
- SILVA, A.S.da; SILVA, M.K.da; OLIVEIRA, C.B.; et al. Eficácia de drogas contra *Giardia muris* em camundongos *Mus musculus* naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.1, p.175-178, 2008.
- WARN, P.A.; BRAMPTON, M.W. ; SHARP, A.; et al. Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. **Laboratory Animal**. v.37, p.126-131, 2003.

Recebido: 04/03/2015
Aceito: 03/11/2015