

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INCERLANDE SOARES DOS SANTOS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Tritrichomonas muris* (GRASSI, 1879) (PARABASALIA: TRITRICHOMONADIDAE) EM HAMSTER GOLDEN (*Mesocricetus auratus*) (WATERHOUSE, 1839) PARA CONTROLE PARASITOLÓGICO DE INSTALAÇÕES DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Rio de Janeiro

2019

INCERLANDE SOARES DOS SANTOS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Tritrichomonas muris* (GRASSI, 1879) (PARABASALIA: TRITRICHOMONADIDAE) EM HAMSTER GOLDEN (*Mesocricetus auratus*) (WATERHOUSE, 1839) PARA CONTROLE PARASITOLÓGICO DE INSTALAÇÕES DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Dissertação apresentada, como um dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB/Fiocruz.

Orientadoras:

Dra. Márcia Cristina Ribeiro Andrade - ICTB/Fiocruz
Prof^a Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus - UFRRJ

Rio de Janeiro

2019

Soares dos Santos, Incerlande.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Tritrichomonas muris* (GRASSI, 1879) (PARABASALIA: TRITRICHOMONADIDAE) EM HAMSTER GOLDEN (*Mesocricetus auratus*) (WATERHOUSE, 1839) PARA CONTROLE PARASITOLÓGICO DE INSTALAÇÕES DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO / Incerlande Soares dos Santos. - Rio de Janeiro, 2019.

108 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2019.

Orientadora: Márcia Cristina Ribeiro Andrade.

Co-orientadora: Vera Lúcia Teixeira de Jesus.

Bibliografia: f. 1-108

1. *Tritrichomonas muris*. 2. Hamster golden. 3. *Mesocricetus auratus*. 4. Identificação de *Tritrichomonas muris*. 5. Morfologia. I. Título.


INCERLANDE SOARES DOS SANTOS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Tritrichomonas muris* (GRASSI, 1879) (PARABASALIA: TRITRICHOMONADIDAE) EM HAMSTER GOLDEN (*Mesocricetus auratus*) (WATERHOUSE, 1839) PARA CONTROLE PARASITOLÓGICO DE INSTALAÇÕES DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

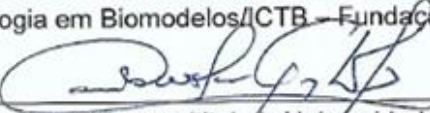
Dissertação apresentada, como um dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB/Fiocruz.

Aprovado em 20/05/2019

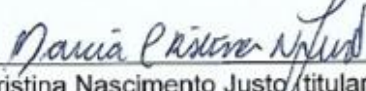
BANCA EXAMINADORA



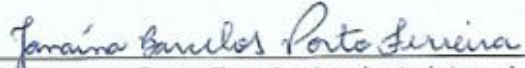
Dra. Isabella de Moura Folhadella Pires (titular e presidente da banca), Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/ICTB – Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz



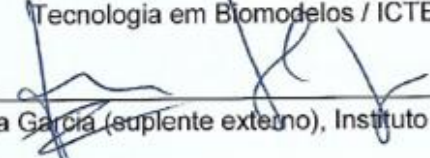
Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes (titular), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ



Dra. Márcia Cristina Nascimento Justo (titular), Instituto Oswaldo Cruz/IOC - Fiocruz



Dra. Janaina Barcelos Porto Ferreira (suplente interna), Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos / ICTB - Fiocruz



Dr. Juberlan Silva Garcia (suplente externo), Instituto Oswaldo Cruz/IOC - Fiocruz

Rio de Janeiro
2019

Dedico a DEUS, razão da minha existência.

À minha amada esposa, Rita Maria dos Santos, e ao meu querido filho, Lemuel Felipe, pelo amor incondicional, companheirismo, paciência e compreensão em todos os momentos de angústias, na elaboração deste trabalho. Amo muito vocês!!!

À minha saudosa avó e mãe, Maria Adelina de Jesus (*in memoriam*), por tanto carinho e cuidado comigo e por ter me ensinado a viver em sociedade. Saudade eterna!

AGRADECIMENTOS

À diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB-Fiocruz), Dra. Carla Freitas Campos; à vice-diretora de Assistência Técnica da Gestão da Qualidade e Tecnologias (ICTB-Fiocruz), Simone Ramos; e à chefe do Serviço de Controle da Qualidade Animal/SCQA (ICTB-Fiocruz), Lilian Gonçalves Carvalho, pela inestimável oportunidade que me foi dada de cursar o mestrado e realizar este trabalho nas dependências do laboratório do SCQA.

À Dra. Maria Inês Doria Rossi, coordenadora do Mestrado Profissional em Ciência em Animais de Laboratório (MPCAL/ICTB-Fiocruz), e ao Dr. Jairo Dias Barreira da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), pelo incentivo em ingressar no curso de pós-graduação e valiosa ajuda inicial deste trabalho.

À minha querida amiga e orientadora, Dra. Márcia Cristina Ribeiro Andrade (ICTB), por seus ensinamentos, profissionalismo e conversas informais, de onde tirávamos diversas experiências de vida e de pesquisa. Por sua paciência e dedicação em me apoiar e por me mostrar que podemos melhorar a cada dia. Sempre com muita humildade e carinho. Sou grato por você ter sido minha orientadora na graduação e agora no mestrado. Você, para mim, é referência de profissional e um ser humano espetacular.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus (UFRRJ), que acreditou no meu potencial. Foi a primeira a gostar do projeto, demonstrando sempre boa vontade e me incentivando ao máximo com ideias para enriquecer cada vez mais o nosso trabalho. Sempre disponível para me ajudar, mostrando-me toda a grandiosidade acadêmico-científica da UFRRJ. Em todos os momentos a professora Vera fez questão de me transmitir o seu vasto conhecimento sobre o protozoário estudado. A senhora não foi somente co-orientadora, mas, em muitos momentos, foi minha conselheira, confidente, mãe e, acima de tudo, amiga. Uma referência profissional e pessoal para a minha vida.

A toda a equipe do SCQA, pelo convívio agradável, fazendo-me sentir em um ambiente verdadeiramente profissional e, ao mesmo tempo, familiar. Em especial, agradeço à Carla Silva de Santana, Cleber Hooper da Silva, Alex Almeida e Larine Fiuza, por nossa grande jornada na Seção de Parasitologia do SCQA. À Anna

Carolina Nogueira Machado (SCQA), pela ajuda em compilar os resultados do meu trabalho nos gráficos e pela demonstração de amizade.

À Dra. Caroline Cunha Carreiro (UFRRJ), por todo o suporte técnico das práticas laboratoriais realizadas neste trabalho, demonstrando ter um coração generoso e bondoso, ajudando-me com carinho e dedicação.

À Josilene Pedreira Andréa e Daniele Dias dos Santos, do Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos/SCRL (ICTB-Fiocruz), pela amizade ao longo dos anos e auxílio no levantamento de dados da colônia de hamster. À Alessandra de Cássia Araújo (SCRL), pela constante contribuição relacionada à colônia de hamster analisada. Da mesma forma, agradeço à Dra. Fabienne Petitinga de Paiva (SCRL), pela ajuda com o levantamento histórico da criação de hamster golden do ICTB.

À Dra. Suzana Côrte Real Faria, pela forma delicada que me recebeu em seu laboratório e por permitir a realização dos procedimentos de microscopia eletrônica e sua parceira no Laboratório de Biologia Estrutural (LBE) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz). À Sandra Maria Oliveira Souza, do LBE (IOC-Fiocruz), pela presteza no auxílio das técnicas de preparo das lâminas da microscopia eletrônica.

À minha querida amiga e veterinária, minha eterna mentora, Belmira Ferreira dos Santos, pela amizade, paciência e sensatos ensinamentos na área da Ciência em Animais de Laboratório ao longo dos anos. Sempre sábia em dirimir minhas dúvidas sobre criação e manejo de roedores, especialmente a de hamsters golden, contribuindo imensamente na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Wlamir Corrêa de Moura, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-Fiocruz), pelas análises estatísticas do presente trabalho.

Às minhas grandes amigas, Cleide Borges, Renata Calil e Viviane Nistaldo, por compartilharem comigo momentos importantes da minha vida, sejam de alegrias, risadas, estresses, tristezas, lágrimas derramadas e, sobretudo, agradeço pela amizade sincera por todos esses anos.

Ao amigo Flávio Veras, do Serviço de Gestão do Trabalho/SGT (ICTB-Fiocruz), pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos de dificuldade.

A todas as colaboradoras da Coordenação de Ensino e Mestrado Profissional em Ciência em Animais de Laboratório do ICTB-Fiocruz, Fátima Fernandes, Raquel Argento, Etinete do Nascimento e Maria Carolina Sousa, pelo tratamento acolhedor e cordial a mim dispensado.

Ao corpo docente do MPCAL (ICTB-Fiocruz), meu muito obrigado por seus ensinamentos, transmitindo com humildade seus conhecimentos e experiências profissionais no decorrer das aulas do mestrado.

Aos meus colegas do mestrado com quem tive o prazer de conviver, Alessandra Feijó, André Abbagliato, Bárbara Meireles, Josilene de Souza, Patrícia Reid e Valéria Cristina Marques, por vivenciarmos juntos momentos de lutas e conquistas durante os dois anos de curso.

Ao Prof. Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes (UFFRJ), por seus ensinamentos e boas conversas, por ter dividido comigo um pouco da sua incontestável experiência acadêmica e de vida e por todo apoio durante minhas visitas no seu laboratório.

À Dra. Isabella Folhadella Pires (ICTB), por ter feito uma importante “ponte” profissional entre mim e a Dra. Vera Lúcia de Jesus, por seu estímulo ao meu trabalho e pela amizade expressada.

Ao meu querido professor de educação física da academia da ASFOC-Fiocruz, Diego Ferreira, por toda orientação nos exercícios físicos, ajudando-me a minimizar o meu estresse e por suas palavras de apoio nos meus momentos de angústia.

À farmacêutica, Taline Ramos Conde (INCQS-Fiocruz), pela presteza em me subsidiar apoio laboratorial em todos os momentos que precisei.

A todos os colaboradores do ICTB-Fiocruz, amigos e colegas de batalhas diárias que muito admiro, por terem contribuído direta e indiretamente com o meu engrandecimento profissional e, particularmente, com a realização desta dissertação. Em especial, expresso meu sincero reconhecimento aos Drs. Antenor Andrade, Sebastião Enes Reis Couto e Célia Virgínia Pereira Cardoso, que representam o alicerce de construção de uma história que hoje chamamos de Ciência em Animais de Laboratório!

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme tuas forças, porque no além para onde tu vais, não há obra, nem projetos, nem conhecimento, nem sabedoria alguma”.

Eclesiastes 9:10

RESUMO

Neste trabalho foram realizadas técnicas de identificação, com base na morfologia e foi avaliado o ciclo de vida de *Tritrichomonas muris* em hamsters golden (*Mesocricetus auratus*), procedentes do ICTB-Fiocruz. Para a identificação do protozoário, foram realizados exames parasitológicos por método direto da mucosa intestinal, além dos métodos de Willis-Mollay, Dennis Stone & Swanson e exame direto a fresco a partir das fezes formadas. A caracterização morfológica foi efetuada por análise morfotintorial por meio dos métodos de coloração de Panótico rápido e Giemsa, além de análises ultraestruturais de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). Para avaliar o ciclo de vida deste agente etiológico, foi feito cultivo *in vitro* dos protozoários em dez meios sintéticos. A partir destes, foram detectados os meios que mais se adaptaram em termos de multiplicação, sendo quatro destes selecionados para delinear uma curva de crescimento e, assim, avaliar efetivamente a evolução da sua morfologia e o tempo de sua sobrevivência no meio selecionado. Um estudo retrospectivo feito entre 2005 e 2018 das parasitoses desta criação revelou elevada prevalência de *T. muris* em todos os anos de análise. A elevada carga parasitária de *T. muris* acarretou sinais clínicos nos animais acometidos, indicando que o mesmo pode ser patogênico e não comensal. Os métodos parasitológicos feitos a partir da mucosa intestinal e das fezes formadas mostraram peculiaridades inerentes do protozoário que se manifestaram de acordo com as suas diferentes fases do ciclo de vida. Quando realizado exame direto a fresco no interior da mucosa intestinal, identificou-se a forma trofozoítica, enquanto que nas fezes formadas, observou-se a forma de pseudocisto. Todos os métodos de identificação e de caracterização morfológica demonstraram a presença do protozoário, sendo possível averiguar as técnicas mais apropriadas de avaliação de *T. muris*. O exame direto é melhor método parasitológicos, enquanto Willis-Mollay uma técnica ineficaz de identificação de *T. muris*. Em relação à análise morfotintorial, verificou-se que ambas as técnicas de coloração adotadas (Panótico rápido e Giemsa) permitem uma boa visualização do protozoário. As análises processadas por MET e MEV demonstraram semelhanças entre as ultraestruturas de *T. foetus* e *T. muris*. No tocante à curva de crescimento de *T. muris* feita a partir de meios sintéticos, considerou-se o Diamond's como o meio "padrão-ouro" para o crescimento do protozoário, sendo, contudo, necessário atentar-se ao tempo das

análises, desde a coleta das amostras até o seu processamento, devido ao curto período de sobrevivência do protozoário (\cong 6 horas). Os resultados obtidos permitiram aprimorar o conhecimento de *T. muris*, viabilizando implantar técnicas apropriadas à sua identificação e caracterização morfológica, direcionando, assim, manejos técnicos com os animais e contribuindo sobremaneira com a comunidade científica mundial.

Palavras-chaves: *Tritrichomonas muris*, Hamster golden, *Mesocricetus auratus*, Identificação de *Tritrichomonas muris*, Morfologia.

ABSTRACT

In this work, identification techniques based on the morphology of trophozoites and the life cycle of *Tritrichomonas muris* on golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) from the ICTB-Fiocruz were performed. For the identification of the protozoan, parasitological examinations by direct method of the intestinal mucosa were performed, besides the coprological methods of Willis-Mollay, Dennis Stone & Swanson and the direct fresh examination from the feces samples. The morphological characterization was performed by morpho-staining methods analysis through Fast Panotic and Giemsa, as well as ultrastructural analyzes of transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). To evaluate the life cycle of this etiological agent, *in vitro* culture was carried out in ten culture media. From these, the means that most favored the multiplication process were indicated, four of them being selected to delineate a growth curve and, thus, to effectively evaluate the evolution of its morphology and the time of its survival in the selected medium. A retrospective study done between 2005 and 2018 of the parasitoses of this breeding revealed a high prevalence of *T. muris* in all the years of analysis. The high parasitic load of this etiological agent caused clinical changes in the affected animals, indicating that it may be pathogenic and not commensal. The parasitological methods made from the intestinal mucosa and the feces formed indicated peculiarities inherent to this protozoan that manifested themselves according to their different phases of the life cycle. When a fresh direct examination was performed from the inside of the intestinal mucosa, the trophozoite form was identified, while in the formed stools the pseudocyst form was observed. All methods of identification and morphological characterization have demonstrated the presence of the protozoan, and it is possible to ascertain the most appropriate techniques for the evaluation of *T. muris*. Direct examination is the best parasitological method, while Willis-Mollay is an ineffective technique for *T. muris* identification. Regarding the morphotintorial analysis, it was found that both adopted staining techniques (Panotic Rapid and Giemsa) allow a good visualization of the protozoan. The analyzes processed by TEM and SEM showed similarities between the ultrastructures of *T. fetus* and *T. muris*. With respect to the growth curve of *T. muris* made from synthetic media, Diamond's was considered the "gold standard" medium for protozoan growth, however, it is necessary to take into account the time of the analyzes, since the collection of the samples until their processing, due to the short period of survival of the protozoan (\cong 6 hours). The observed results allowed to improve the knowledge of *T. muris*, making it possible to implant diagnostic techniques appropriate to its identification and morphological characterization, thus directing technical management with the animals and greatly contributing to the world scientific community.

Keywords: *Tritrichomonas muris*, Hamster golden, *Mesocricetus auratus*, Identification of *Tritrichomonas muris*, Morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Tritrichomonas muris</i> em hamster golden (<i>Mesocricetus auratus</i>)	30
Figura 2: Representação esquemática da morfologia de <i>Tritrichomonas muris</i> , evidenciando as principais estruturas anatômicas	36
Figura 3: Exame direto das fezes a fresco, distinguindo o preparo correto do incorreto	38
Figura 4: Quantitativo de hamsters golden utilizados em pesquisa na Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, no período de 2005 a 2018	44
Figura 5: Quantitativo de fêmeas e machos de hamsters golden utilizados em pesquisa na Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, no período de 2005 a 2018	44
Figura 6: Método de flutuação espontânea Willis & Mollay	52
Figura 7: Método de Sedimentação espontânea de Dennis-Stone & Swanson (1954)	53
Figura 8: Exame direto a fresco	54
Figura 9: Cultivo de <i>Tritrichomonas muris</i> em meios sintéticos e passagens para novos meios	57
Figura 10: Contagem celular	59
Figura 11: Aspecto morfotintorial de <i>Tritrichomonas muris</i> em lâminas para pesquisa de morfologia	62
Figura 12: Fotomicrografia de campo claro de trofozoítos de <i>Tritrichomonas muris</i> (400X) pelo método direto	65
Figura 13: Trofozoítos de <i>Tritrichomonas muris</i> encontrados na mucosa intestinal de hamster golden, pelo método direto	67
Figura 14: Pseudocistos de <i>Tritrichomonas muris</i> encontrados em fezes formadas de hamster golden, pelo método direto	66
Figura 15: Análise comparativa entre três métodos coproparasitológicos a partir de diferentes regiões intestinais de hamsters golden (<i>Mesocricetus auratus</i>) para pesquisa de <i>Tritrichomonas muris</i>	67

Figura 16: Concentração das células de <i>Tritrichomonas muris</i> isoladas das fezes de hamster golden, a cada 3 horas, cultivadas nos meios de cultivo Diamond's, PBS, TCM199 e CHD	75
Figura 17: Curva de crescimento de <i>Tritrichomonas muris</i> de hamsters Golden em diferentes meios de cultivo (Diamond's, 199, PBS e CHD)	75
Figura 18: Análise morfotintorial de <i>Tritrichomonas muris</i> a partir de amostras fecais de hamsters golden (<i>Mesocricetus auratus</i>) pela coloração de Panótico® rápido	76
Figura 19: Análise morfotintorial de <i>Tritrichomonas muris</i> em hamster golden (<i>Mesocricetus auratus</i>) por coloração de Giemsa®	77
Figura 20: <i>Tritrichomonas muris</i> em amostra da mucosa intestinal de hamster golden	80
Figura 21: Visão estrutural panorâmica de <i>Tritrichomonas muris</i> em amostras da mucosa intestinal de hamster golden	81
Figura 22: Visão geral de <i>Tritrichomonas muris</i> em forma de pseudocistos observados por vários aumentos	82
Figura 23: Ultraestrutura do trofozoíto de <i>Tritrichomonas muris</i>	83
Figura 24: Pseudocistos de <i>Tritrichomonas muris</i>	84
Figura 25: Prevalência dos parasitos identificados na criação hamsters golden (<i>Mesocricetus auratus</i>) entre 2005 e 2018	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Algumas espécies de <i>Trichomonas</i> , com hospedeiro, local de infecção e patogenicidade	26
Quadro 2: Carga parasitária encontrada nas regiões intestinais dos hamsters golden (<i>Mesocricetus auratus</i>) analisados	67
Quadro 3: Cultivos <i>in vitro</i> para pesquisa de <i>Tritrichomonas muris</i> a partir de amostras fecais de hamsters golden (<i>Mesocricetus auratus</i>)	69
Quadro 4: Concentração de trofozoítos de <i>Tritrichomonas muris</i> ($\times 10^5$ células/ml) em diferentes meios de cultivo	74
Quadro 5: Comparação das colorações de Panótico x Giemsa para identificação de <i>Tritrichomonas muris</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

BHI - brain heart infusion

CECAL - Centro de Criação de Animais de laboratório

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

FELASA - Federation of European Laboratory Animal Science Associations

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

ICTB - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

IDI - Identificação interna

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

KRAS - *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

ml - Mililitros

NaCl - Cloreto de sódio

PBS - phosphate buffered saline

SCQA - Serviço de Controle da Qualidade Animal

SCRL - Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos

TCM-199 - *Supplemented Tissue Culture Medium 199* (Meio de Cultivo Tecidual-199 Suplementado)

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

µl - microlitro

Mo - Membrana Ondulante

Nu - Núcleo

Ax - Axóstilo

Co - Costa

FP - Flagelo Posterior

PC - Corpo parabasal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO TEÓRICA	25
2.1. Etiologia	25
2.2. Epidemiologia	25
2.2.1. Os parabasalídeos em diferentes espécies animais	25
2.2.2. <i>Tritrichomonas muris</i> nas criações de animais de laboratório	27
2.3. Patogênese	27
2.4. Modo de transmissão	28
2.5. Ciclo de vida de <i>Tritrichomonas muris</i> em hamster golden	29
2.6. Morfologia e estrutura	30
2.6.1. Pseudocisto	32
2.6.2. Trofozoíto	32
2.6.3. Descrição das estruturas morfológicas de <i>Tritrichomonas muris</i>	32
2.6.3.1. Axóstilo	33
2.6.3.2. Costa	33
2.6.3.3. Núcleo	34
2.6.3.4. Flagelos recorrentes e anteriores	34
2.6.3.5. Hidrogenossomos	34
2.6.3.6. Membrana ondulante	35
2.7. Diagnóstico	36
2.7.1. Microscopia direta (exame a fresco)	37
2.7.2. Cultivo <i>in vitro</i>	38
2.7.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	40
2.7.4. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	40
2.7.5. Animais-sentinela em colônias de hamsters golden	41

2.8. Hamsters golden como biomodelos na pesquisa biomédica: um breve histórico	41
2.8.1. Colônia de hamsters do ICTB-Fiocruz e sua origem	42
3. JUSTIFICATIVA	45
4. OBJETIVOS	47
4.1. Objetivo geral	47
4.2. Objetivos específicos	47
5. MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1. Princípios éticos	48
5.2. Animais	48
5.3. Coleta das amostras	49
5.4. Diagnóstico laboratorial	49
5.4.1. Método direto da mucosa intestinal	50
5.4.2. Métodos coproparasitológicos	51
5.4.2.1. Análise comparativa entre os três métodos coproparasitológicos adotados	54
5.4.3. Cultivo <i>in vitro</i>	55
5.4.3.1. Curva de crescimento de <i>Tritrichomonas muris</i> em meios de cultivo sintéticos	58
5.4.3.2. Análise estatística	59
5.4.4. Diagnóstico morfológico	60
5.4.4.1. Avaliação morfotintorial	60
5.4.5. Microscopia eletrônica das amostras biológicas	62
5.4.5.1. Processamento para MEV.....	62
5.4.5.2. Processamento para MET	63
5.5. Estudo retrospectivo das enteroparasitoses diagnosticadas em hamsters golden	64

5.6. Registro fotográfico	64
6. RESULTADOS	65
6.1. Exame da mucosa intestinal por necropsia	65
6.2. Exames coproparasitológicos da mucosa intestinal e das fezes formadas	65
6.3. Cultivo de <i>Tritrichomonas muris in vitro</i>	68
6.3.1. Curva de crescimento	73
6.3.1.1. Análise estatística	74
6.4. Avaliação morfotintorial	75
6.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de <i>Tritrichomonas muris</i>	79
6.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de <i>Tritrichomonas muris</i>	82
6.7. Levantamento parasitológico retrospectivo de 2005 a 2018	84
7. DISCUSSÃO	85
8. CONCLUSÕES	89
9. PERSPECTIVAS	90
10. REFERÊNCIAS	91
11. ANEXOS	98
Anexo 1: Recomendações da FELASA quanto à frequência de monitoramento sanitário de parasitos a serem examinados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>)	98
Anexo 2: Publicações relacionadas à dissertação	99
Anexo 3: Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais, n. LW-27/17 (CEUA-Fiocruz)	100
Anexo 4: Formulário de solicitação de exames do Serviço de Controle da Qualidade Animal/SCQA (ICTB-Fiocruz)	101
Anexo 5: Ficha de monitoramento sanitário utilizado na colônia de hamster golden no Serviço de Criação de Roedores e lagomorfos/SCRL (ICTB-Fiocruz)	102
Anexo 6: Esquema de representação quantitativa de carga parasitária por	

cruzes	103
Anexo 7: Composição dos meios de cultivo <i>in vitro</i> utilizados no estudo	104

1. INTRODUÇÃO

A experimentação animal consiste em uma atividade primordial para o avanço e desenvolvimento científico, com contribuições inestimáveis para a saúde humana e animal. Entretanto, inúmeros microrganismos que acometem os animais de laboratório, especialmente os de origem parasitária, interferem nos protocolos de pesquisas, comprometendo a confiabilidade dos resultados. Doenças assintomáticas que podem ocorrer nestes substratos vivos não devem passar despercebidas pelo pesquisador, uma vez que determinadas infecções podem estimular alterações metabólicas e fenômenos adversos que modificariam substancialmente os resultados obtidos, acarretando consideráveis impactos científicos e econômicos (HERNÁNDEZ et al., 2008).

Neste contexto, a Federação das Associações Europeias de Ciência em Animais de Laboratório (FELASA) atua como um guia de controle sanitário para diferentes tipos de criações animais, que, muitas vezes, atualiza-se e se adequa às circunstâncias da realidade institucional envolvida. Aponta, desta forma, alternativas para uma monitorização mais frequente em caso da necessidade de selecionar outros agentes patogênicos não contemplados em suas recomendações, mas que ocorrem com frequência em determinadas colônias, passíveis de causar sérios impactos científicos nas pesquisas biomédicas relacionadas (FELASA, 2014).

Aliado ao monitoramento sanitário periódico, as barreiras sanitárias (físicas, químicas e biológicas) nas colônias de animais de laboratório são imprescindíveis em biotérios de criação, manutenção e experimentação, pois dificultam ou minimizam os efeitos da interação entre os agentes biológicos de risco com o homem e o animal, tornando-se imperiosas, conforme o grau de risco do microrganismo relacionado (REIS; FRANCO, 2012).

Infecções parasitárias por protozoários presentes em colônias de hamsters golden, *Mesocricetus auratus* (WATERHOUSE, 1839) para fins científicos representam um problema de difícil eliminação no ambiente, fato que enfatiza a adoção compulsória de rotinas de controle sanitário nas criações (HERNÁNDEZ et al., 2008). Assim, o programa de monitoramento sanitário anual é imprescindível para a avaliação da qualidade dos animais, levando-se em conta a presença de

infecções como forma de melhorar as condições higiênico-sanitárias de um plantel (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006). Neste sentido, é importante seguir recomendações de órgãos regulamentadores que norteiam tanto os agentes infecciosos a serem examinados quanto as suas respectivas periodicidades dentro das criações.

Dentre os parasitos que afetam roedores de laboratório, a presença do protozoário *Tritrichomonas muris* (GRASSI, 1879) em uma instalação de hamsters golden, pode ser um bioindicador de quebra de barreiras sanitárias, auxiliando na conduta do aprimoramento do manejo e melhoria do padrão de qualidade dos animais (RIBEIRO; CRUZ; MARQUES, 2017). A elevada incidência de *T. muris* induz os profissionais desta área a desenvolver metodologias que possam melhor conduzir este controle sanitário.

Tritrichomonas muris é um protozoário flagelado comensal que acomete o intestino grosso de roedores, comumente encontrado em biotérios de criação. A transmissão ocorre por contato com os cistos através da via oro-fecal e, apesar de não ser reconhecido como um agente patogênico, há relatos de diarreia e anorexia quando o animal infectado apresenta uma elevada carga parasitária. Além disso, determinadas proteínas advindas de *T. muris* em roedores sabidamente infectados comprometem diretamente a resposta imunológica dos animais e causam desordens de metabolismo nos mesmos (KASHIWAGI et al., 2009; ESCALANTE, 2017).

Devido à facilidade de transmissão entre os animais suscetíveis, especialmente por contato em camas contaminadas, a elevada prevalência deste protozoário representa um forte indicador de que há fatores ambientais, estruturais ou técnicos que podem promover a sua propagação nas criações, enfatizando, assim, a relevância da vigilância e manutenção das barreiras de biossegurança (REIS; FRANCO, 2012).

Assim, torna-se imprescindível desenvolver métodos diagnósticos para identificação e caracterização do referido protozoário, constituindo uma ferramenta fundamental para o melhor entendimento do agente e possíveis intervenções ambientais que se fizerem necessárias. De posse da identificação e da caracterização do parasito em questão, a avaliação da eficiência das medidas profiláticas e terapêuticas ao longo do tempo, consiste na próxima etapa de um estudo mais apurado deste processo (NOVAES; VILHENA, 2015). A escolha da técnica diagnóstica dependerá do grau de sensibilidade e especificidade do método,

além das condições de recursos disponibilizados (DE CARLI, 2011). Recomenda-se o uso de mais de um método de detecção, especialmente mediante baixa carga parasitária (NOVAES; VILHENA, 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho visou aprofundar os estudos de identificação e caracterização morfológica do protozoário *T. muris* em hamsters golden, destacando sua importância epidemiológica em um biotério de criação, a fim de implantar a metodologia de diagnóstico mais adequada em uma rotina de monitoramento parasitológico, procedente de uma instalação de animais de laboratório.

2. REVISÃO TEÓRICA

2.1. Etiologia

Tritrichomonas muris (GRASSI, 1879) é um protozoário pertencente ao filo Parabasalia, ordem Trichomonadida, classe Trichomonadea, família Trichomonadidae (LINDSAY; SUNDERMANN; BAKER, 2007; CAVALIER-SMITH, 1993). Os indivíduos desse filo são protistas anaeróbicos, flagelados, caracterizados por conter aparelho, corpo e filamentos parabasais, sendo o seu corpo representando o complexo de Golgi. O protozoário foi descrito como simbiote de hamster golden (*Mesocricetus auratus*), com elevada prevalência em instalações de animais de laboratório (BAKER, 2007).

É um dos protozoários flagelados mais comumente diagnosticados em roedores. Os trofozoítos são encontrados no intestino delgado e grosso (ceco) de diferentes espécies de camundongos, ratos e hamsters (RIBEIRO; CRUZ; MARQUES, 2017). Os tricomonados são geralmente identificados por sua forma de trofozoíto, embora algumas espécies apresentem a forma de pseudocisto. O trofozoíto, de formato piriforme, mede entre 10-14 por 16-26 µm. Apresenta um núcleo vesicular anterior, três flagelos longos na região apical, uma membrana ondulante que percorre toda a extensão longitudinal do corpo, exteriorizando-se como um flagelo livre (RIBEIRO; CRUZ, MARQUES, 2017).

2.2. Epidemiologia

2.2.1. Os parabasalídeos em diferentes espécies animais

Alguns membros da família *Trichomonadidae* provocam danos graves em seu hospedeiro, enquanto outros membros, como o *Tritrichomonas muris* os danos ainda são desconhecidos, não tendo sido evidenciadas lesões no hospedeiro e sua respectiva patogenicidade (COL, 2003).

Trichomonas gallinae (RIVOLTA, 1878) acomete o trato digestivo superior e vários órgãos de diferentes grupos de aves, sendo particularmente comum nos

columbiformes. Outras espécies de *Trichomonas* parasitam répteis, peixes e anfíbios (MILKEN et al., 2008). *Tritrichomonas foetus* (RIEDMÜLLER, 1928) é encontrado no trato genital de bovinos e zebuínos e no trato intestinal de gatos domésticos. *Tritrichomonas suis* (GRUBY & DELAFOND, 1843), pode ser encontrado na cavidade nasal, estômago, ceco, cólon e, ocasionalmente, no intestino delgado de porcos domésticos (GOOKIN et al., 1999; LEVY et al., 2003).

O protozoário *Pentatrichomonas hominis* (DAVAINE, 1860), por possuir cinco flagelos, encontrado nas fezes de cães e gatos, pode ser facilmente confundido com trofozoítos de *Giardia lamblia* (STILES, 1915). Este provavelmente é um agente comensal, tem um ciclo de vida direto e sua transmissão entre animais ocorre pela via oro-fecal (JERGENS; WILLARD, 2004). O quadro 1 apresenta as espécies de *Trichomonas*, assim como os respectivos hospedeiros, local de infecção e importância na epidemiologia médica e veterinária.

Quadro 1: Algumas espécies de parabasilídeos, com hospedeiro, local de infecção e patogenicidade

Hospedeiro	Parasito e espécie	Local da infecção	Patogenicidade	Referência
Aves de rapina e pombo	<i>Trichomonas gallinae</i>	Trato digestório e orofaringe	Lesões no bico e na garganta (Patogênico)	Borji, H., et al., 2011
Porcos domésticos	<i>Tritrichomonas suis</i>	Cavidade nasal, estômago, ceco e colo	Patogênico	Lun e Gajadhar, 1999
Bovinos	<i>Tritrichomonas foetus</i>	Órgãos genitais	Patogênico	Riedmüller, 1928
Humanos	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Órgãos genitais	Patogênico	Van Der Pol, 2018

2.2.2. *Tritrichomonas muris* nas criações de animais de laboratório

Diversos parasitos são encontrados em criações de animais de laboratório, tanto por infecções parasitárias não completamente eliminadas, quanto por introdução dos agentes nas colônias por um processo de quarentenamento inadequado. Animais recém-chegados de outras procedências podem apresentar parasitismo enzoótico. A invasão de roedores silvestres contaminados nas instalações de criação também é uma fonte importante de parasitose, pois a mesma acarreta quebra de barreira sanitária (RIBEIRO; CRUZ, MARQUES, 2017).

Com os avanços tecnológicos, foi possível reduzir a prevalência e, até mesmo, erradicar determinadas doenças parasitárias de relevância epidemiológica nos biotérios brasileiros. De acordo com Ribeiro et al. (2017), a melhoria contínua das estruturas físicas das instalações associadas à implantação de técnicas de controle sanitário mais rigorosas são medidas cruciais no auxílio do controle parasitológico. Vale frisar que a maioria dos agentes patogênicos de roedores pode ser eliminada das colônias por derivação cesariana, técnica recomendada para efetuar a “limpeza” das criações animais, incluindo *T. muris* (COL, 2003).

2.3. Patogênese

A patogênese de *T. muris* em animais hospedeiros permanece obscura devido à escassez de estudos mais aprofundados sobre o protozoário (KASHIWAGI et al., 2009). O trofozoíto é uma forma ativa do protozoário, que se alimenta e se reproduz por diferentes processos (NEVES, 2011), podendo, muitas vezes, ser encontrado em abundância em fezes de hamsters golden (COL, 2003).

Zarei et al. (2018) e Fox et al. (2007) constataram que proteínas advindas de *T. muris* em roedores sabidamente infectados, comprometeram diretamente a resposta imunológica dos animais e causaram desordens de metabolismo. Em testes experimentais os efeitos de *T. muris* no hospedeiro foram analisados por proteômica, utilizando-se 10 proteínas diferentes, expressas em intestinos de roedores infectados por *T. muris*, em comparação com intestinos não infectados. As proteínas identificadas representaram várias funções relacionadas, principalmente ao estresse, resposta imune, metabolismo e transdução de sinal (ESCALANTE,

2017). Os resultados sugeriram que a infecção por *T. muris* pode afetar processos que se aclimatam às mudanças ambientais causadas pela infecção no intestino dos roedores (KASHIWAGI et al., 2009).

2.4. Modo de transmissão

A transmissão ocorre por contato com o pseudocisto do protozoário através da via oro-fecal e lambadura, apesar de não ser reconhecido como um agente patogênico, há relatos de sintomatologia em animais parasitados. Já foram observados sintomas, como diarreia e anorexia, quando o animal infectado apresenta elevada carga parasitária (FOX et al., 2007). Após a ingestão dos pseudocistos nas fezes dos hospedeiros (hamsters, camundongos e ratos), a proliferação ocorre no lúmen intestinal, sem invasão de tecido (RIBEIRO; CRUZ; MARQUES, 2017).

Os pseudocistos são ingeridos por coprofagia e seguem através da faringe e esôfago, até alcançarem o estômago (KOYAMA; ENDO; ASAH, 1987). Após a ingestão do protozoário, este irá se desenvolver como forma infectante quando houver uma carga parasitária mínima de cinco pseudocistos. Uma vez no intestino, os pseudocistos vão se transformar em trofozoítos, onde irão se multiplicar no lúmen intestinal (RIBEIRO; CRUZ; MARQUES, 2017). A multiplicação de *T. muris* se faz por divisão binária e o período pré-patente¹ compreende de 3 a 10 dias (WAGGIE et al., 1994).

Enquanto os pseudocistos percorrem pelo trato intestinal, estes são transformados em trofozoítos através da ação do fluido digestivo (RIBEIRO; CRUZ; MARQUES, 2017 ; COL, 2003). Na porção final do intestino delgado (íleo), ocorre a absorção das moléculas dos alimentos, decorrente das atividades enzimáticas, sofrendo, assim, uma absorção de líquidos provenientes do bolo fecal. Ainda no íleo, grande parte da água existente no bolo alimentar também é absorvida e restos alimentares não digeridos chegam ao intestino grosso, onde continua ocorrendo a absorção de água. Já no ceco, são formadas as fezes pastosas, onde ocorre a

¹Período que decorre entre a penetração do agente etiológico e o aparecimento das primeiras formas detectáveis do agente.

transformação da forma de trofozoíto em pseudocisto, sendo finalmente expelido pelas fezes (MAROUNEK et al., 2016).

2.5. Ciclo de vida de *Tritrichomonas muris* em hamster golden

O ciclo de vida de *T. muris* em hamsters golden e em outros animais de laboratório não foram completamente compreendidos até os dias atuais. Historicamente, afirmou-se que não são formados cistos e a transmissão é por ingestão de trofozoítos identificados nas fezes (FOX et al., 2007). Estudos posteriores revelaram que o pseudocisto é a forma intermediária e identificada nas fezes por esfregaço de hamsters golden e armênios, sugerindo que esta pode ser a forma integrante da fase infecciosa (FOX et al., 2007; KASHIWAGI et al., 2009).

Cistos verdadeiros de vários tricomonas são considerados raros; afirma-se, portanto, que estes são pseudocistos, incluindo os de *T. muris* (MATTERN; DANIEL, 1980). Dentre os agentes da família Trichomonodidae, apenas a ultraestrutura de pseudocistos de *Trichomitus batrachorum* (PERTY, 1852) foi descrita, sendo esta de estrutura fina e móvel (MATTERN; DANIEL, 1980). Basicamente, os pseudocistos representam trofozoítos que internalizaram seus flagelos anteriores e recorrentes, bem como membranas ondulantes, tornando-se imóveis. Estes não são cistos verdadeiros devido à ausência de uma parede cística, confirmada por microscopia eletrônica, e também falta de qualquer excisão durante a metamorfose de trofozoíto para pseudocisto em *T. muris* (MATTERN; DANIEL, 1980).

Em síntese, o ciclo de vida do agente ocorre da seguinte forma: os pseudocistos são ingeridos oralmente com fezes por coprofagia do hospedeiro e transformados em trofozoítos através de formas intermediárias, principalmente pela ação do fluido digestivo enquanto percorrem pelo trato digestivo (KOYAMA et al., 1987; KASHIWAGI et al., 2009). Quando tais formas se estabelecem no ceco, o habitat normal do flagelado, os trofozoítos transformados começam a se multiplicar. Ao passar do ceco para o cólon, o conteúdo é solidificado por desidratação no cólon e muda para grumos fecais. Os trofozoítos nas fezes são afetados pela mesma desidratação e se transformam em pseudocistos, passando por estágios intermediários. Portanto, os organismos excretados pelo hospedeiro nas fezes são principalmente os pseudocistos (KOYAMA et al., 1987).

É importante ressaltar que os pseudocistos são considerados infecciosos para os roedores. A transformação reversível de pseudocistos em trofozoítos através de formas intermediárias, pode ser controlada *in vitro* com uma certa facilidade (KOYAMA et al., 1987). Na figura 1 observa-se o ciclo de vida direto de *T. muris*.

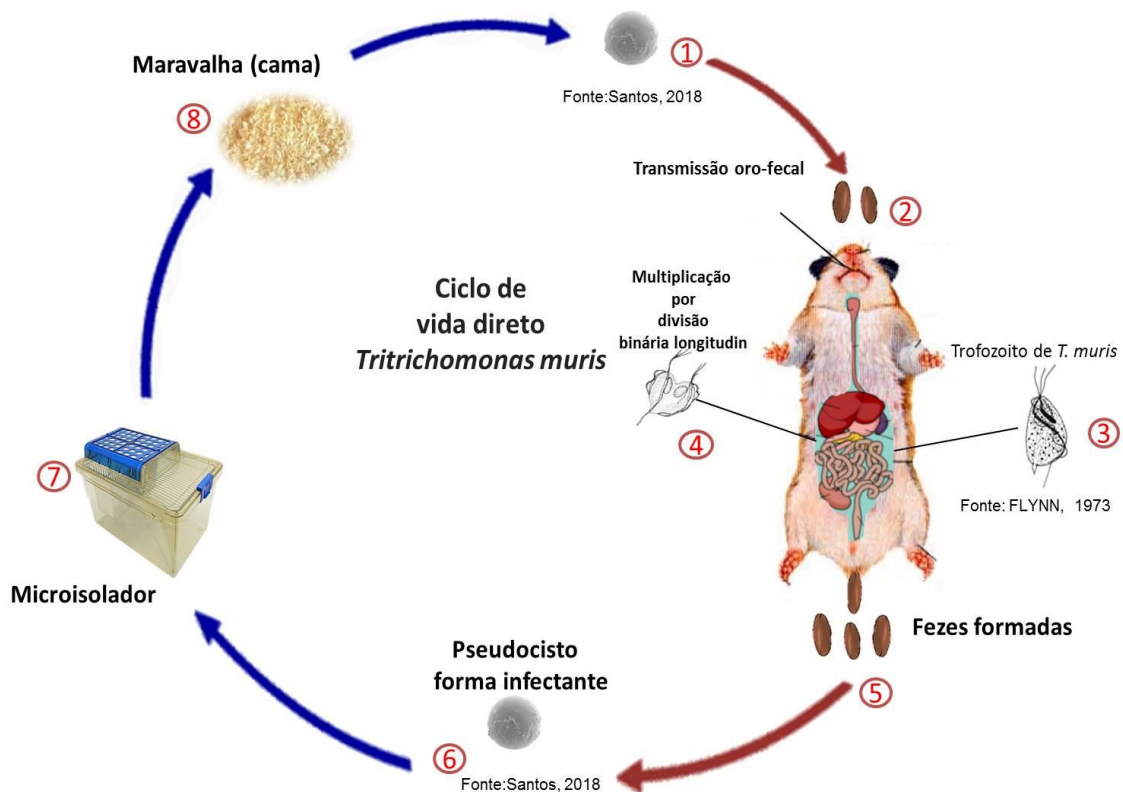


Figura 1: Ciclo de vida de *Tritrichomonas muris* em hamster golden (*Mesocricetus auratus*). Fonte: Incerlande Soares dos Santos.

2.6. Morfologia e estrutura

Os protozoários são organismos unicelulares, eucariotos, providos de um núcleo diferenciado e de outras organelas membranosas. Sua classificação se dá pela forma e localização dessas organelas especializadas, relacionadas com a

locomoção (flagelos, cílios, pseudópodos ou microtúbulos), nutrição e proteção (RIBEIRO; CRUZ; MARQUES, 2017).

As espécies do gênero *Tritrichomonas* são anaeróbias facultativas, medem cerca de 10 µm de comprimento por 7 µm de largura, apresentam-se como uma célula polimorfa (trofozoíto), tanto no hospedeiro natural, quanto em meios de cultura. Um bastonete rígido percorre seus corpos, termina em uma extremidade livre e é constituído pela justaposição de microtúbulos (citoesqueleto) (LEMOS; ZAPATA, 2014).

Morfologicamente, *T. muris* se caracteriza por possuir formato piriforme, fusiforme ou ovóide, três flagelos anteriores livres e um quarto que se dirige até a parte posterior e é associado à membrana ondulante, que se une na sua margem interna à costa. O axóstilo se estende do pólo anterior ao posterior confere rigidez à célula e se projeta, formando o espinho terminal. Próximo ao pólo anterior se localiza o núcleo e o blefaroplasto; um número variado de vacúolos pode ser encontrado no citoplasma (ORTEGA-MORA; ROJO-VASQUEZ, 1996).

Três formas diferentes de *T. muris* foram descritas: i) forma de trofozoíto, que se prolifera por fusão binária; ii) forma intermediária, de formato ovalado a piriforme do trofozoíto e é célula fagocitária ativa, com seus flagelos internalizados; e iii) pseudocisto ou forma infecciosa do parasito.

Tritrichomonas muris não tem a capacidade de fazer um verdadeiro cisto. A formação de pseudocistos ocorreu sob condições experimentais ou de estresse, como alterações de pH ou consumo de nutrientes. Na verdade, trata-se de um mecanismo de defesa do parasito, podendo ser visualizado no meio de cultura natural (ZAREI, et al., 2018).

A forma do protozoário se modifica facilmente, pois não existem, sob a membrana, estruturas de sustentação que confirma rigidez. Em meio a uma população de flagelados, aparecem com frequência, em maior ou menor número, certos indivíduos que emitem pseudópodes do tipo lobópode e, algumas vezes, assumem aspecto inteiramente ameboide, com ou sem flagelos livres (REY, 2015).

O parasito apresenta motilidade, uma vez que possui uma membrana ondulante, sendo esta uma característica marcante nas preparações de lâminas a fresco; acompanhada por um flagelo recorrente por todo corpo de *T. muris* (COL, 2003).

2.6.1. *Pseudocisto*

O pseudocisto é uma estrutura importante no ciclo de transmissão oro-fecal do protozoário, visto que o processo de transformação da forma de trofozoíto em pseudocisto é um processo reversível (GRANGER et al., 2000). Nesta fase, o protozoário é capaz de se dividir e manter as estruturas internas com morfologia normal; portanto, também é considerada como uma forma infectante para o hospedeiro (PEREIRA-NEVES et al., 2003).

Os pseudocistos de *T. muris* são células morfologicamente arredondadas, com quase 8 µm de diâmetro, sem parede celular verdadeira e sem flagelos externos, demonstrando ser um modo de proteção quando em um ambiente “improvável” (ZAREI et al., 2018).

Constitui a forma inativa do protozoário, constituindo a sua forma de resistência.

2.6.2. *Trofozoíto*

O trofozoíto é o estágio adulto ou forma ativa de *T. muris*, capaz de se alimentar, movimentar e se reproduzir por divisão binária longitudinal (DANIEL, 1971). Consiste em um estágio intermediário do ciclo do agente, possuindo uma forma ovalada, medindo cerca de 16 µm a 26 µm de comprimento por 10 µm a 14 µm de largura (ZAREI et al., 2018) (Figura 2).

Pode ser encontrado em abundância no intestino, sítio de maior atividade reprodutiva do protozoário e não é capaz de sobreviver ao meio ambiente (COL, 2003).

2.6.3. *Descrição das estruturas morfológicas de Tritrichomonas muris*

As principais estruturas morfológicas de *T. muris* são detalhadamente caracterizadas a seguir (Figura 2).

2.6.3.1. Axóstilo

O axóstilo, em forma de fita, constituído pela justaposição de microtúbulos (de 20nm de diâmetro cada um), percorrendo toda a extensão do corpo celular e fazendo saliência no pólo posterior. Consiste em uma estrutura de sustentação do corpo celular. Também participa de diversos processos ligados a divisão celular. A extremidade anterior continua-se, por justaposição, com outra formação de igual estrutura denominada pelta (escudo), que à maneira de um colarinho, sustenta as paredes de uma depressão, no pólo anterior dos protozoários, por onde saem os flagelos (REY, 2015).

Consiste em uma das estruturas que faz parte do citoesqueleto dos parabasalídeos e forma o chamado complexo pelta-axóstilo, que dá sustentação ao corpo celular. Essa estrutura percorre todo o comprimento do corpo celular, sendo a parte anterior mais ampla formando o capitollium. Após o núcleo, a estrutura do axóstilo parece reduzir de largura até seu segmento terminal, onde se projeta a partir da extremidade posterior da célula como uma ponta fina ou semelhante a uma cauda (SANTOS, 2016).

2.6.3.2. Costa

A costa é uma estrutura presente em todos os tricomonadídeos. Assim como as fibras parabasais, a costa é cilíndrica e formada por proteínas que apresentam uma periodicidade com bandas claras e escuras. Contudo, a costa é maior e mais larga do que as fibras parabasais (VILELA, 2010). A costa é uma faixa que, ao microscópio eletrônico, mostra nítidas estrias transversais entrelaçadas em uma rede de estrutura com malhas hexagonais e percorre o citoplasma nas proximidades do flagelo recorrente, tendo partido do mesmo blefaroplasto. O corpo parabasal, correspondente à uma designação antiga, que hoje sabemos compreender as fibras parabasais (uma mais longa que a outra), com estriação transversal ao longo das quais dispõe-se o aparelho de Golgi, com suas membranas paralelas e suas vesículas (REY, 2015).

2.6.3.3. Núcleo

Os tricomonadídeos, quando não se encontram em divisão, apresentam um único núcleo localizado na região anterior da célula. O envoltório nuclear destes parasitos se apresenta como em eucariotos superiores. A porção mais externa se continua com o retículo, enquanto a membrana interna está voltada para a matriz nuclear. Inúmeros complexos de poros típicos estão distribuídos ao longo do envoltório (VILELA, 2010). O núcleo é estrutura globular situada no endoplasma, possuindo vesículas com cromatina em grânulos pequenos ou finos distribuídos no interior (LEMOS; ZAPATA, 2014).

2.6.3.4. Flagelos recorrentes e anteriores

Os flagelos, tanto os anteriores como os recorrentes, têm origem nos corpúsculos basais, localizados na região anterior da célula. O flagelo recorrente se mantém ao longo da superfície da célula, formando a membrana ondulante. Os flagelos participam do movimento da célula; a batida dos flagelos anteriores é um tipo ciliar, exibindo traços eficazes e de recuperação, ao passo que o flagelo recorrente bate em uma forma típica de onda flagelar. Isto faz com que o corpo do parasito gire em torno do seu próprio eixo e produza uma rotação. O número de flagelos varia dentre as diferentes espécies (CARREIRO, 2018). *Tritrichomonas muris* possui um núcleo vesicular anterior, de formato piriforme e três flagelos anteriores na região apical e uma membrana ondulante que percorre toda a extensão longitudinal do corpo, exteriorizando como flagelo livre (MARQUES; CRUZ, 2009). Os flagelos têm uma função importante na interação do parasito com a célula hospedeira, já que a cito-adesão do protozoário às células se dá inicialmente com seu flagelo anterior e recorrente e, posteriormente, com o corpo celular (SILVA FILHO; SOUZA, 1988).

2.6.3.5. Hidrogenossomos

O hidrogenossoma é uma organela produtora de hidrogênio, evolucionária relacionada à mitocôndria e é encontrada nos protozoários do filo Parabasalia, bem como em alguns agentes fúngicos ciliados de vida livre. Apresenta semelhanças e

diferenças em relação às mitocôndrias (BENCHIMOL, 2009). Os hidrogenossomos se apresentam em grande número no citoplasma celular e, geralmente, estão associados a grânulos de glicogênio e a estruturas do citoesqueleto, como o axóstilo e a costa. Possuem dupla membrana e uma vesícula periférica, que é independente da dupla membrana e da matriz, formando um compartimento distinto. A associação dos hidrogenossomos com o retículo endoplasmático foi descrita como um indício de fornecimento de lipídios para o crescimento dos hidrogenossomos (CARREIRO, 2018).

2.6.3.6. Membrana ondulante

Na membrana ondulante encontra-se concentrada uma extensa trama de filamentos estáveis do citoesqueleto, membrana que liga o flagelo recorrente ao corpo do parasito (GERMOT et al., 1996). A superfície celular é a membrana plasmática da célula associada ao seu glicocálice, e apresentada como um mosaico composto de adesinas, receptores de proteínas da matriz extracelular e outras moléculas, que exercem uma função importante na interação parasito-hospedeiro e influenciam o sistema imunológico. Suas ondulações de bordas quadradas são muito evidentes (CHINCHILLA, 1987).

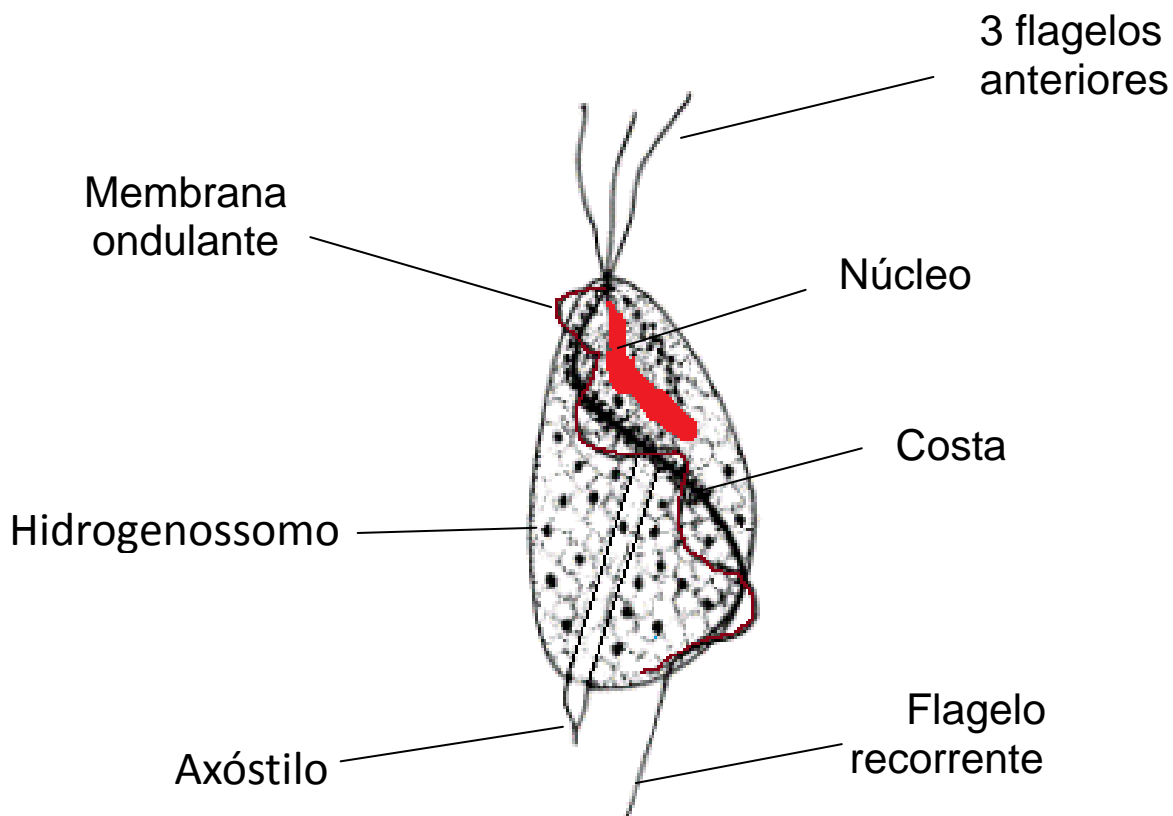


Figura 2: Representação esquemática da morfologia de *Tritrichomonas muris*, evidenciando as principais estruturas anatômicas. Fonte: Adaptado de FLYNN (1973).

2.7. Diagnóstico

Os exames endoparasitológicos representam um valioso recurso para o diagnóstico das doenças parasitárias em animais de laboratório. Os parasitos intestinais são habitualmente identificados por sua morfologia ao microscópio e estes exames consistem nas pesquisas de cistos, trofozoítos e oocistos de protozoários, ovos, adultos e larvas de helmintos (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009).

Ao realizar os exames parasitológicos dos animais das colônias, é importante pontuar, primeiramente, qual será o objetivo do uso da informação de tal exame e, então, identificar o teste mais apropriado para uma análise específica. É válido também levar em conta que a presença de uma determinada parasitose pode ser aceitável na instalação estudada; porém, com a possibilidade de aplicar um

tratamento nos animais afetados, com posterior avaliação da eficácia do mesmo (MARQUES, 2006).

Historicamente, testes de maior sensibilidade diagnóstica para a detecção de vários tipos de parasitos foram passíveis de definir procedimentos de eutanásia do animal. O método molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) permite direcionar este tipo de decisão dentro de um plantel, pois o teste é capaz de detectar endo e ectoparasitos de diferentes espécies de ratos, hamsters, cobaias, coelhos, camundongos, bem como de outros roedores (PARKINSON et al., 2011).

Durante as atividades da necropsia, os trofozoítos são encontrados na luz do duodeno de animais infectados e podem ser evidenciados em microscopia óptica, com aumentos de 100 ou 400 vezes. Além da identificação morfológica, as espécies também podem ser diferenciadas pelos tipos de locomoção. O uso de métodos de coloração, como giemsa, lugol e hematoxilina férrica, auxiliam na identificação de cistos e trofozoítos (BICALHO, 2012).

Os métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico de *T. muris* em hamsters golden incluem técnicas derivadas e adaptadas daquelas utilizadas nos diagnósticos de controle parasitológico rotineiros. A utilização de cada uma delas dependerá do interesse da pesquisa a ser realizada, avaliando o grau de sensibilidade e especificidade do método empregado, além de considerar o recurso disponível, visando o fator custo-benefício.

2.7.1. *Microscopia direta (exame a fresco)*

O exame a fresco é o teste mais fácil e rápido empregado na rotina laboratorial para o diagnóstico de protozoários. Visa à detecção de trofozoítos móveis nas fezes frescas diluídas em solução salina (NaCl 0,85%). Normalmente, uma gota é colocada sobre uma lâmina de vidro e examinada em microscopia óptica à procura de organismos com formato e motilidade característicos de trichomonadídeos, cujo movimento é progressivo, errático e rotacionado em seu próprio eixo. Devido ao diagnóstico ser dependente da visualização de organismos vivos, as amostras de fezes devem ser preferencialmente formadas, ou direto da mucosa intestinal e processadas rapidamente (SANTOS et al., 2016).

Os parasitos podem ser detectados em animais por meio de técnicas variadas, incluindo amostras de animais vivos ou submetidos à eutanásia

(PARKINSON et al., 2011). Em animais vivos o diagnóstico adequado para *T. muris* é o exame direto das amostras fecais, normais ou diarreicas (SANTOS et al., 2018a).

Em animais submetidos à eutanásia, o exame direto da mucosa intestinal é realizado a partir das amostras intestinais, acondicionadas em placas de Petri descartáveis individualmente. O conteúdo intestinal é macerado em solução salina a NaCl 0,85%, para posteriores análises qualitativa e quantitativa dos endoparasitos do conteúdo intestinal. A amostra macerada é estendida em uma lâmina, cobrindo-a com uma lamínula de suspensão, devendo a amostra ter espessura fina o suficiente para permitir a passagem da luz (SANTOS et al., 2016).

A figura 3 demonstra duas formas do método a fresco (errado e certo), atentando-se que é necessário homogeneizar a amostra, evitando distorções no seu preparo, preservando, assim, a forma natural do microrganismo envolvido. Desta forma, é preciso não deixar uma porção não homogeneizada de fezes no centro da lâmina, a fim de evitar erro de diagnóstico.

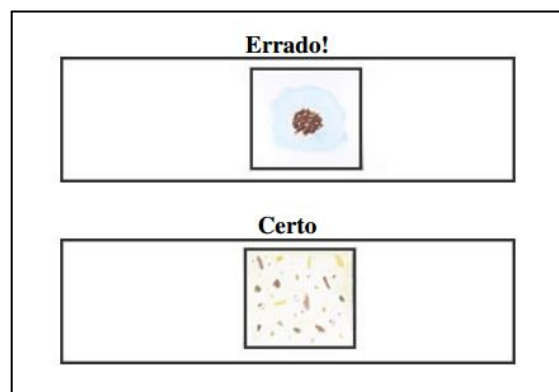


Figura 3: Exame direto das fezes a fresco, distinguindo o preparo correto do incorreto.

Fonte: https://marilandabellini.files.wordpress.com/2011/08/aula_pratica_fezes_1.pdf

2.7.2. *Cultivo in vitro*

Seguindo a mesma rotina adotada no diagnóstico de *T. muris*, o cultivo *in vitro* é o segundo passo para avaliar amostras de fezes. Permite a multiplicação dos protozoários até o ponto em que se possa observá-los ao microscópio. Possui um grau de sensibilidade maior do que o exame a fresco. O meio de cultivo mais

frequentemente utilizado na rotina dos laboratórios foi desenvolvido por Diamond (1957) e é chamado pelo mesmo nome. Embora seja um método mais sensível, a sua especificidade é considerada baixa, porque várias espécies de parabasalídeos podem crescer, não sendo possível fazer uma correta identificação. Apesar disso, o crescimento dos protozoários em meios de cultivo permite a confecção de esfregaços dos trofozoítos para identificação morfológica.

O cultivo de parasitos pode ser útil para estudos biológicos e morfológicos. Em protozoários, o cultivo intestinal não é uma metodologia utilizada como rotina em laboratórios de diagnóstico, considerando que nem todos os parasitos são passíveis de crescimento *in vitro* para *T. muris*, isolados de hamsters golden (SANTOS et al., 2017b). Este procedimento tem sido considerado uma excelente escolha na busca da compreensão de sua evolução (SAEKI et al., 1983).

As amostras fecais podem ser transportadas a fresco ou em PBS (phosphate buffered saline) em temperatura ambiente, protegidas da luz e o mais rápido possível ao laboratório, pois o diagnóstico depende da viabilidade do microrganismo. A presença de protozoários móveis, de morfologia piriforme, confere a positividade ao material. A evidência de flagelos anteriores e um flagelo posterior deve ser confirmada pelos métodos de coloração (APPEL et al., 1993) e, apesar das adversidades, o crescimento dos protozoários em meios de cultura permite, por meio da confecção de esfregaços, a identificação morfotintorial dos trofozoítos (SANTOS et al., 2017a).

Os meios de cultivo seletivos também seriam outra forma de diagnóstico diferencial. Porém, o cultivo em meios específicos, como o mais popular deles, desenvolvido por Diamond (1957), não tem possibilitado a diferenciação entre as espécies de parabasalídeos; no entanto, impedem o crescimento de outros flagelados, como os do gênero *Giardia*, por exemplo (SANTOS, 2016).

Na detecção do protozoário em amostras genitourinárias, o material coletado deve ser introduzido e transportado em meio de Diamond's modificado, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e mescla de antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina B) (DIAMOND, 1957).

A partir do cultivo de protozoários *in vitro* em diferentes meios sintéticos, é possível delinear uma curva de crescimento, com a finalidade de conferir qual dos meios testados é o mais adequado para a sua multiplicação, levando-se em conta os respectivos elementos que os compõem. Em se tratando de *T. muris*, a curva de

crescimento constitui uma importante ferramenta para avaliar a capacidade de adaptação do agente fora do hospedeiro, considerando a evolução da sua morfologia e o tempo de sua sobrevivência no meio selecionado (SAEKI et al., 1983).

2.7.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Na microscopia eletrônica direta ou de transmissão (MET), a imagem do espécimen é formada simultaneamente à passagem do feixe de luz através do microscópio. O emprego da MET é bastante difundido no estudo de materiais biológicos, pois ele permite definição de imagens intracelulares, viabilizando estudos de morfologia celular, bem como aspectos gerais das organelas (GALLETI, 2003).

Trata-se de um instrumento importante nos estudos mais minuciosos das estruturas celulares, da organização molecular de vírus ou mesmo de constituintes subcelulares. Existem, entretanto, peculiaridades em sua confecção, uma vez que a técnica exige uma alta resolução, onde os espécimens devem ser processados de modo que as estruturas obtidas sejam extremamente finas para uma visualização tridimensional (BOZZOLA; RUSSELL, 1999).

2.7.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os microscópios eletrônicos de varredura (MEV) apareceram no mercado, pela primeira vez, em 1965, e desde então têm se revelado indispensáveis em muitos tipos de pesquisas biológicas, contribuindo para a classificação e taxonomia de insetos e fungos, estudo da morfologia de pólenes e em pesquisas de superfícies de diversas estruturas de plantas e animais (GALLETI, 2003). Também é ideal para estudar a topografia de superfície de objetos sólidos; porém, fornece pouca ou nenhuma informação sobre a estrutura interna. Seu poder separador não se iguala ao do microscópio de transmissão, embora seja adequado para muitos propósitos. Deve-se ter em mente o objetivo da pesquisa que está desenvolvendo, visto que este indicará qual equipamento deverá ser empregado para se atingir os resultados desejados (BOZZOLA; RUSSELL, 1999).

No MEV, um feixe de elétrons extremamente estreito é usado para “varrer” o espécimen; isto é, ele é movido para diante e para trás enquanto passa através do

mesmo. O feixe tem vários efeitos sobre o espécimen, dos quais o principal para nossa finalidade é que ele faz com que a própria amostra biológica emita elétrons. A imagem é construída em sequência, no tempo, à medida que o material envolvido é varrido (BOZZOLA; RUSSELL, 1999).

2.7.5. Animais-sentinela em colônias de hamsters golden

Animais-sentinela são animais imunocompetentes introduzidos em um biotério de criação já estabelecido, sendo mantidos neste local como forma de controle sanitário, por no mínimo quatro semanas antes do início do programa de monitoramento. O emprego de animais sentinela é muito eficaz e traz excelentes resultados, principalmente porque são capazes de minimizar erros nos diagnósticos. O ideal é utilizar uma amostragem em torno de 10 a 12 animais, dependendo do tamanho da criação (MOLINARO, et al, 2009).

Animais-sentinelas podem ser indiretos (animais expostos a materiais sujos por animais residentes, tais como cama, água ou ração) ou diretos (animais introduzidos na mesma gaiola dos animais residentes). Os sentinelas devem ser alojados na mesma unidade que os animais de criação durante, pelo menos, quatro semanas antes do monitoramento sanitário, nas mesmas condições de criação. Períodos de exposição mais longos (10 a 12 semanas) são melhores, pois podem ser necessários mais tempo para a exposição aos microrganismos. Geralmente, os animais sentinela devem ser da mesma espécie da população a ser examinada. (FELASA, 2014).

2.8. Hamsters golden como biomodelos na pesquisa biomédica: um breve histórico

Os hamsters golden (*M. auratus*) possuem características que os tornam excelentes biomodelos nos mais variados campos da pesquisa biomédica, incluindo investigações comportamentais, de cronobiologia e desenvolvimento da patogênese de diversas doenças humanas. Devido às suas peculiaridades genéticas e imunológicas, a espécie apresenta tolerância a tumores homólogos e heterólogos de origem humana. Há relatos de pesquisas acerca de carcinomas celulares que acometem os humanos, afetando notadamente os pulmões. Tanto em hamsters

quanto em humanos, esse câncer está associado a mutações do gene KRAS (*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*). Os resultados obtidos a partir do desenvolvimento do referido câncer pulmonar em hamsters, consistem em informações inestimáveis para a elucidação da doença em humanos (SUCKOW; STEVENS; WILSON, 2012).

As bolsas gústrais, sítios de privilégios imunológicos, são particularmente utilizadas em estudos que envolvem o implante e o crescimento de tumores originários de outras espécies, incluindo o de origem humana (MORI; CHELINI; COUTO, 2017).

Registros indicam que os primeiros exemplares foram trazidos da Alemanha por volta de 1960 e doados ao Instituto Biológico, órgão mantido pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (MORI; CHELINI; COUTO, 2017). De acordo com Nilsson e Corrêa (1966), o vírus do aborto equino foi isolado em hamster golden no ano de 1963, tornando-se este um modelo animal ideal para a referida pesquisa. Provavelmente, esse estudo seja um dos primeiros relatos da utilização do hamster na pesquisa no Brasil (MORI; CHELINI; COUTO, 2017). Os hamsters são utilizados, especialmente, em ensaios relacionados a infecções experimentais (BORJI et al., 2014). São biomodelos relevantes ainda em pesquisas radiobiológicas, endócrinas, odontológicas, além de experimentos envolvendo inúmeras doenças infecciosas em projetos de pesquisas (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

2.8.1. Colônia de hamsters do ICTB-Fiocruz e sua origem

De acordo com o Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos (SCRL) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), dados extraídos do Sistema Informatizado de Controle de Produção Animal,² constataram que foi utilizado um total de 9.828 hamsters para pesquisas diversas, no período de 2005 a 2018 (Figura 4). Este número explicita a importância deste animal de laboratório na Fiocruz, enfatizando que se trata de uma elevada demanda institucional. A figura 5 destaca o número de fêmeas e machos utilizados

²Extraído do relatório de fornecimento de hamster golden, no site do SICOPA, 2018. Disponível em: <http://www.sicopa.cecal.fiocruz.br>.

na Fiocruz no período 2005 a 2018, demonstrando um maior quantitativo de fêmeas utilizadas em comparação com o uso de machos.

Em 2005, cerca de 120 hamsters golden chegaram ao Brasil, para formar colônias de matrizes e de produção na Fiocruz, fruto de um convênio firmado entre o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-Fiocruz), Salvador/BA e a empresa americana Charles River³. Ao chegarem no aeroporto Internacional do Rio de Janeiro/RJ, metade dos animais (30 machos e 30 fêmeas) foi encaminhada ao biotério do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal) e atual Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) e a outra metade foi transportada para o biotério do CPqGM-Fiocruz.

Os animais foram importados pelo Dr. Albert Ko, pesquisador visitante no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do CPqGM, atual Instituto Gonçalo Moniz (IGM-Fiocruz), com o objetivo de desenvolver um kit diagnóstico, uma vacina e o estudo da história natural da leptospirose, uma vez que o hamster constituía o modelo animal mais utilizado para estas finalidades. Os projetos denominaram-se: 1) “Desenvolvimento de vacina contra a leptospirose humana”, 2) “Desenvolvimento de teste rápido para o diagnóstico da leptospirose” e 3) “Manutenção de cepas de *Leptospira* sp. para o estudo da leptospirose em Salvador/BA”.

Existia outra colônia de hamsters golden antes da chegada desses animais. Entretanto, após a importação dos novos exemplares, o Cecal extinguiu a criação antiga, fazendo acasalamentos somente com os animais recém-chegados.

Os hamsters foram importados dos Estados Unidos da América (EUA) com a garantia de que apresentavam *status* SPF (Specific Pathogen Free). No entanto, ao realizar exames de monitoramento sanitário, constatou-se a presença de *Giardia* sp., *Syphacia* sp. e *T. muris*.

A criação se manteve até janeiro de 2019, quando então o ICTB-Fiocruz decidiu finalizá-la, sendo todos os animais ($n = 35$) transferidos para o biotério do IGM-Fiocruz-Bahia.

³Informação encontrada no site: <https://www.criver.com>

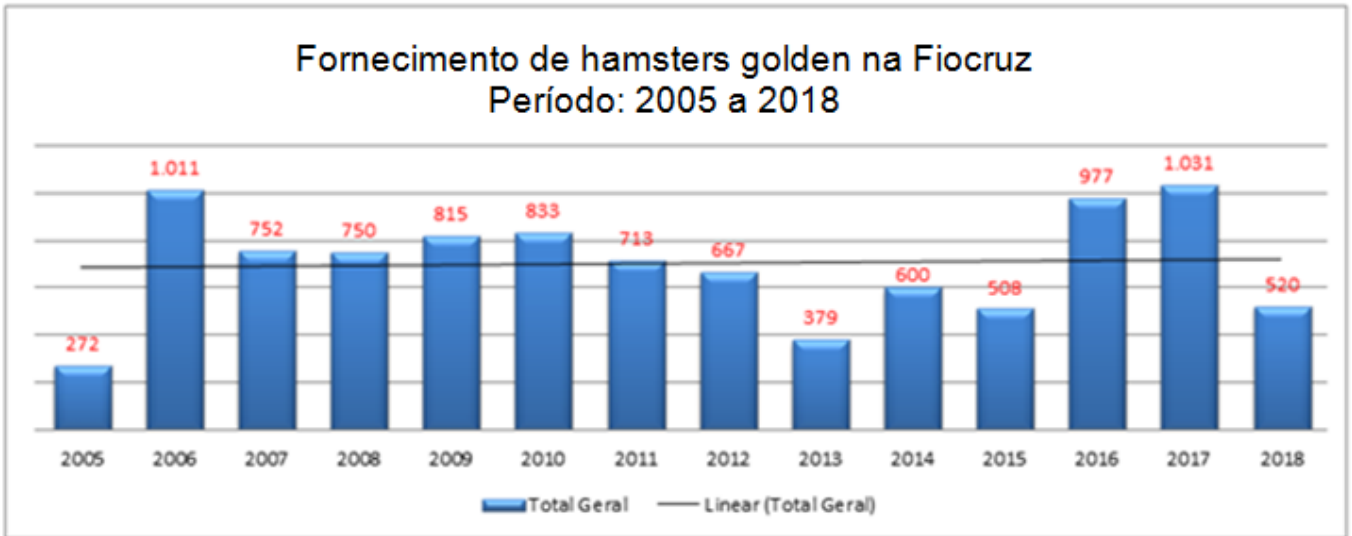


Figura 4: Quantitativo de hamsters golden utilizados em pesquisa na Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, no período de 2005 a 2018. Fonte: SICOPA (Sistema Informatizado de Controle de Produção Animal), ICTB-Fiocruz.

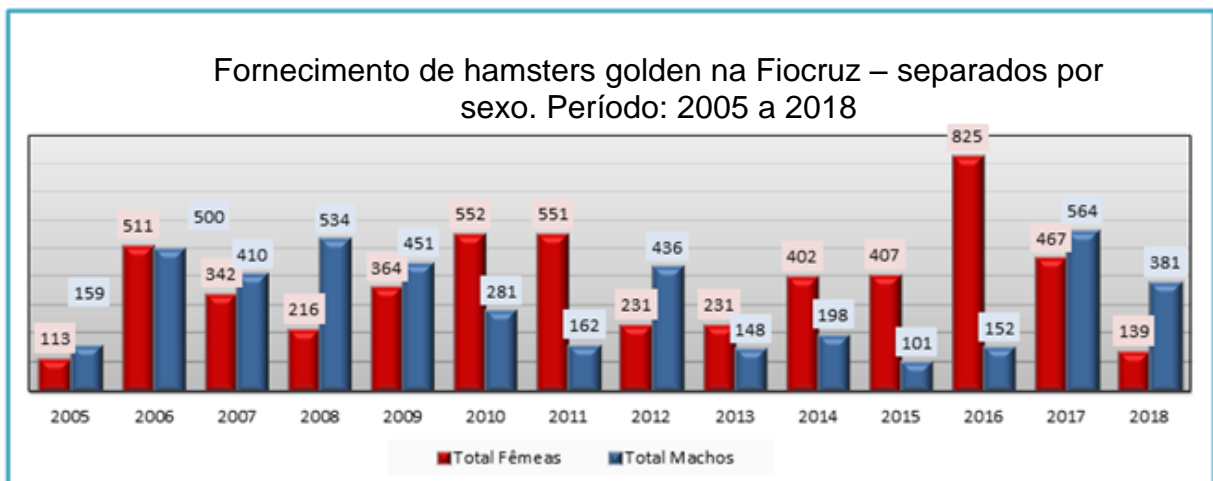


Figura 5: Quantitativo de fêmeas e machos de hamsters golden utilizados em pesquisa na Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, no período de 2005 a 2018. Fonte: SICOPA (Sistema Informatizado de Controle de Produção Animal) ICTB-Fiocruz, 2018.

3. JUSTIFICATIVA

Dentre os parasitos que acometem animais de laboratório, a FELASA recomenda a inclusão de *T. muris* no planejamento de monitoramento sanitário, assim como a frequência de análises deste agente em roedores (Anexo 1).

É sabido que protozoários da espécie *T. muris* são indesejáveis em criações de roedores, pois embora existam relatos de não serem patogênicos, os mesmos podem ser sinalizadores de contaminação nas colônias por outros agentes potencialmente patogênicos. Ressalta-se, todavia, que há autores que descrevem manifestações clínicas nos hamsters causadas por este parasito, demonstrando que este pode se tornar patogênico mediante elevada carga parasitária. Independente do seu grau de patogenia e capacidade de acarretar sintomatologias nos animais, pode-se afirmar que a presença desses protozoários indica quebra de barreiras sanitárias nas criações animais.

Assim, a partir da constatação da presença de *T. muris* em hamsters golden através de uma análise parasitológica em uma amostragem de animais procedentes de uma instalação de animais de laboratório, torna-se importante aprofundar os estudos, a fim de reforçar no auxílio da prevenção de possíveis contaminações por estes agentes parasitários, como forma de garantir a preservação de barreiras sanitárias eficientes.

Entretanto, existe pouca informação disponível na literatura sobre o referido protozoário, especialmente sobre a sua patogênese. No que diz respeito aos métodos de cultivo de protista, nem todos os parasitos são passíveis de crescimento *in vitro*, não sendo uma técnica de rotina laboratorial. Porém, é válido considerar que o método de cultivo consiste em um pré-requisito para estudos que requerem pesquisas sobre morfologia e metabolismo do parasito. Com a comprovação de que a análise é de fato eficaz, esta pode constituir uma opção laboratorial útil, tanto nos estudos biológicos como nos morfológicos.

O Serviço de Controle da Qualidade Animal (SCQA) do ICTB conta com um laboratório cuja missão é realizar monitoramentos da sanidade dos animais de laboratório do ICTB-Fiocruz e de outras instituições que solicitem o serviço, adotando programas rigorosos e rotineiros de análises. Realiza exames para pesquisa e diagnóstico clínico, contribuindo para o desenvolvimento científico em

âmbito Nacional. Considera-se uma proposta estratégica para a instituição implantar a técnica de identificação de *T. muris* neste laboratório, a fim de auxiliar no processo de vigilância sanitária deste agente em instalações que mantenham hamsters golden e outros roedores em suas criações para fins científicos.

A equipe do SCQA (ICTB-Fiocruz) recebeu o suporte técnico do grupo do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Instituto de Zootecnia/IZ, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), que detém a expertise no assunto em questão. Trata-se de uma parceria interinstitucional de suma importância, na qual é possível aliar o conhecimento dos profissionais de ambas as instituições, havendo, assim, orientações adequadas na aquisição do aparato tecnológico necessário para a execução do trabalho, viabilizando as análises de controle sanitário nas várias colônias de roedores existentes no Brasil. Outrossim, é importante ressaltar que os estudos da presente dissertação irão gerar incontáveis publicações científicas, endossando ainda mais as atividades de pesquisa do ICTB, que elevou recentemente o seu patamar para a unidade de caráter técnico-científica da Fiocruz. Cabe ressaltar, inclusive, que alguns resultados preliminares deste trabalho já foram publicados (Anexo 2).

Considerando a presença de *T. muris* na colônia de hamster golden analisada neste trabalho, aliada à escassez de literatura sobre o assunto, justifica-se realizar a pesquisa de identificação e caracterização morfológica do agente, visto que tal contribuição fornecerá relevantes subsídios para o aprimoramento do manejo das criações animais no âmbito nacional.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Realizar a identificação e a caracterização morfológica do protozoário *Tritrichomonas muris* em hamsters golden (*M. auratus*) procedentes do Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos/SCRL do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB-Fiocruz), com o intuito de implantar a metodologia de diagnóstico mais adequada em uma rotina de monitoramento parasitológico de hamsters e de todos os roedores suscetíveis ao agente em questão.

4.2. Objetivos específicos

- Diagnosticar e caracterizar morfológicamente o protozoário *T. muris* de hamsters golden através de diferentes métodos;
- Estudar o ciclo de vida de *T. muris* em meios de cultivo e sua transformação de trofozoíto em pseudocisto;
- Avaliar o tempo de multiplicação de *T. muris* adaptado em diferentes meios de cultivo sintéticos, traçando uma curva de crescimento do agente;
- Avaliar a prevalência de *T. muris* nas fezes dos hamsters procedentes do biotério de criação do SCRL (ICTB-Fiocruz);
- Comparar três métodos parasitológicos para o diagnóstico de pseudocistos de *T. muris* em amostras de fezes formadas;
- Realizar um levantamento bibliográfico e mapeamento parasitológico acerca do monitoramento sanitário de hamsters golden, de diferentes faixas etárias e ambos os sexos, no período de 2005 a 2018, nas criações do SCRL.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Princípios éticos

Em consonância aos princípios éticos que norteiam a conduta dos cuidados e uso correto dos animais de laboratório, o presente trabalho está devidamente licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o número nº LW-27/17 (CEUA-Fiocruz) (Anexo 3).

5.2. Animais

Foram utilizados 50 hamsters golden (*M. auratus*) de ambos os sexos, com idade variando de três meses a um ano, com peso corporal entre 100 a 183 g, procedentes do SCRL (ICTB-Fiocruz). Os animais do biotério de criação foram selecionados por amostragem e submetidos a exames parasitológicos a partir das fezes formadas *in natura*, nos períodos de monitoramento sanitário, realizado no SCQA (ICTB-Fiocruz).

Os animais foram nascidos e criados em racks climatizados, mantidos em temperatura ambiente e alojados em gaiolas de plástico, com dimensões de 37 cm de comprimento x 24,2 cm de largura x 24 cm de altura, forradas com maravalha autoclavada, sendo oferecidos água e ração comercial *ad libitum* diariamente.

Conforme as recomendações da FELASA (2014), os hamsters golden foram avaliados em lotes de quatro animais e a colônia foi monitorada trimestralmente. A análise deste estudo foi feita durante dois anos (2017 e 2018), tendo sido utilizada uma amostragem composta por quatro animais da colônia de criação, em sala única, para cada monitoramento, abrangendo um total de oito exames trimestrais relacionados ao programa de monitoramento sanitário propriamente dito, além de quatro exames ocasionais que surgiram por conta de alguns sinais clínicos adversos (ex: diarreia, prostração, pelos eriçados, etc.). Os animais foram escolhidos aleatoriamente a cada trimestre. A quantidade de exemplares incidiu proporcionalmente (10 %) ao tamanho da colônia monitorada.

Os animais eram acompanhados de fichas específicas com seguintes dados: linhagem, idade, sexo, localização e sala, visando facilitar a identificação dos animais estudados para sua rastreabilidade (Anexo 4).

Para organizar o programa de monitoramento sanitário da criação de hamsters no âmbito do ICTB, o laboratório encaminhava previamente ao SCRL um cronograma das análises laboratoriais da colônia, com uma antecedência de três meses, já alertando a equipe técnica sobre a inclusão estratégica dos hamsters-sentinela no interior da sala dos animais, como forma de controle (Anexo 5).

5.3. Coleta das amostras

Os animais foram previamente submetidos à eutanásia no laboratório do SCQA, utilizando 10 mg/kg de Xilazina 2% associada com 200 mg/kg de Cloridrato de Quetamina por via intramuscular, como medicação pré-anestésica e, em seguida, receberam 60 mg/kg de Thiopental 2,5% por via intra-cardíaca. Após a eutanásia, as carcaças foram encaminhadas à Seção da Anatomia Patológica do SCQA para exame macroscópico. Ao realizar o procedimento de necropsia, coletou-se todo o conteúdo do intestino, sendo devidamente identificado. As amostras coletadas foram dispostas em placas de Petri individuais, estéreis e descartáveis (90x15 mm), imersas em 6 ml de solução salina de NaCl (0,85%). Prosseguiu-se, assim, com as análises qualitativa e quantitativa dos endoparasitos da mucosa intestinal.

As amostras obtidas na necropsia, na Seção de Anatomia Patológica do SCQA, foram encaminhadas à Seção de Parasitologia do mesmo Serviço, para serem processadas de diferentes formas, conforme a técnica a ser realizada: exames coproparasitológicos, cultivo *in vitro*, coloração e microscopia eletrônica.

Além da obtenção do material fecal proveniente da mucosa intestinal, também foram analisadas fezes frescas, coletadas pelos próprios técnicos que atuam no manejo direto com os animais.

5.4. Diagnóstico laboratorial

Os exames laboratoriais foram realizados em conformidade com as recomendações da FELASA (2014) (Anexo 1), que selecionam os agentes infecciosos a serem examinados em hamsters golden. Para a obtenção de um maior conhecimento sobre *T. muris*, os métodos de diagnóstico seguiram uma sequência de diferentes técnicas, procurando abranger três momentos de delineamento

experimental: identificação, pesquisa do seu ciclo de vida e caracterização morfológica. Os três delineamentos são descritos a seguir.

I – Delineamento experimental 1:

IDENTIFICAÇÃO DE *Tritrichomonas muris*

A identificação de *T. muris* foi realizada no laboratório do SCQA (ICTB-Fiocruz).

5.4.1. Método direto da mucosa intestinal

Após eutanásia do animal, foi feita uma incisão pré-retroumbilical na linha mediana do abdômen e abertura da musculatura, removendo os intestinos delgado e grosso e colocando-os nas placas de Petri (90 x 15 mm). Como previamente mencionado, todo o conteúdo intestinal coletado na necropsia foi enviado ao Serviço de Parasitologia do SCQA, no qual foi macerado com 6 ml da solução salina, com o uso de uma tesoura de ponta fina (Buck Spencer[®], tamanho 11cm). Uma vez dispostos os intestinos macerados, realizou-se o exame macroscópico através da observação dos órgãos diretamente na placa de Petri de fundo preto, própria para pesquisa de helmintos. Com o auxílio de uma pipeta plástica descartável de 3ml, foi disposta uma alíquota do material, previamente homogeneizado, em uma lâmina de ponta fosca (26x76 mm) e sobrepondo lamínula (24x32 mm). As amostras foram observadas em microscópio óptico binocular (Nikon eclipse Ni[®]) de campo claro, com aumentos de 100x, 200x e 400x.

Para a identificação dos protozoários nas fezes, colocou-se 10 µl da mesma amostra em uma lâmina e observou-se mais uma vez, conforme descrito anteriormente. As amostras foram consideradas positivas quando constatada a presença de protozoários com formato e motilidade semelhantes aos dos trichomonadídeos.

5.4.2. Métodos coproparasitológicos

As amostras de fezes frescas coletadas pelos técnicos bioteristas do SCRL foram encaminhadas à Seção de Parasitologia do SCQA. As fezes foram acondicionadas em coletores plásticos universais de 100 ml e transportadas em recipientes isotérmicos, devidamente identificadas. Uma parte do material foi imediatamente processada pelo método direto para identificar, principalmente, a presença de trofozoítos e pseudocistos de *T. muris*.

No momento do exame, foram retiradas alíquotas de vários pontos do bolo fecal, coletando tanto da superfície como em profundidade. A raspagem do bolo fecal foi sempre realizada com o auxílio de um bastão de vidro. O material fecal oriundo desta raspagem foi homogeneizado em 6 ml de solução salina estéril de NaCl a 0,85% a temperatura ambiente. Uma alíquota desta solução fecal foi transferida para lâmina de vidro ponta fosca (26x76 mm) e foi coberta com lamínula 24 X 32 mm, fazendo-se a leitura em microscópio óptico (aumentos de 200x e 400x). A outra parte da amostra foi homogeneizada e as alíquotas foram dispostas em tubos de centrífuga de 15 ml, de fundo cônico, para a realização de duas técnicas parasitológicas: flutuação Willis-Mollay e sedimentação espontânea de Dennis Stone & Swanson. Todas as amostras foram registradas no livro de parasitologia do ano vigente, anotando a data de chegada do material, espécie animal, número de identificação interna (IDI), sinais e sintomas, técnicas realizadas, resultados e observações.

As lâminas de microscopia foram confeccionadas em duplicata para cada técnica. A leitura foi realizada em microscópio óptico Eclipse Ni-E Nikon®, inicialmente com aumento de 100x e confirmação com aumento de 400x, quando necessário.

Paralelamente, também foram coletadas amostras fecais individuais diretamente da ampola retal do animal para a realização do exame direto a fresco.

➤ Método de flutuação espontânea Willis & Mollay

Para a realização do exame, a bancada foi desinfetada com álcool 70% e forrada com papel filtro; nesta foram disponibilizados todos os materiais do

procedimento: solução saturada de açúcar refinado ($d = 1,29\text{g/ml}$), bastão de vidro, lâmina, lamínula, pipeta Pasteur de 3ml, frasco coletor de fezes e pinça hemostática. Foram coletadas de dois a três gramas de fezes, sendo pesadas em uma balança digital e colocadas em um frasco coletor, onde foram maceradas e filtradas em gaze estéril, transferindo-as para um frasco borel. O volume obtido foi completado com a solução saturada de açúcar, até a borda do frasco borel até formar um menisco, deixando o preparo em repouso por 10 minutos. Encostou-se uma lamínula com o auxílio de uma pinça no menisco (Figura 6), retirando-a rapidamente e colocando-a sobre a lâmina da amostra previamente identificada. Uma vez preparada, a lâmina foi disposta no microscópio óptico de campo claro, onde foi examinada com aumentos de 100x e 400x.

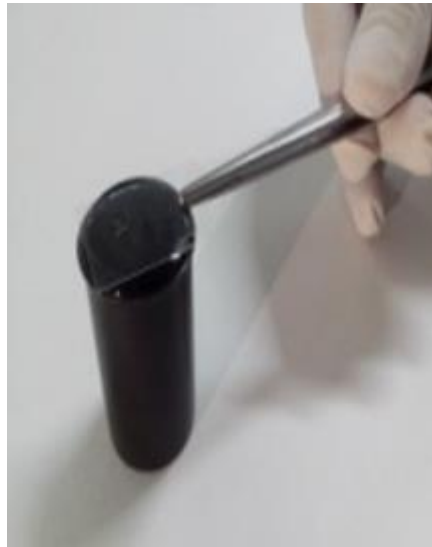


Figura 6: Método de flutuação espontânea Willis & Mollay. Foto: Incerlande Soares dos Santos.

➤ Método de sedimentação espontânea Dennis-Stone & Swanson

Foram utilizados os seguintes materiais: cálice cônico descartável, peneira, gaze, solução de detergente a 0,5%, bastão de vidro, lâmina, lamínula, pipeta Pasteur de 3ml descartável e frasco coletor de fezes.

Os cálices foram identificados conforme a identificação interna (IDI) de amostra. No frasco próprio para exame de fezes, dissolveu-se aproximadamente um grama de fezes em 30 ml de solução de detergente neutro a 0,5%, utilizando um bastão de vidro. A suspensão foi filtrada em um cálice cônico descartável, com

capacidade para 200 ml, usando gaze cirúrgica colocada sobre uma peneira. Completou-se o volume do cálice com 10 ml da solução de detergente neutro a 0,5% (Figura 7), deixando a suspensão de fezes em repouso durante 30 minutos para decantação. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante diretamente (sem pausa), para não misturar o sedimento que foi depositado no fundo do cálice. Foram colocados na lâmina, com a pipeta Pasteur de 3ml plástica descartável, uma gota do sedimento presente no cálice, previamente homogeneizado, e coberto com a lamínula. A lâmina foi analisada em um microscópio óptico de campo claro, com aumentos de 100x e 400x.



Figura 7: Método de Sedimentação espontânea de Dennis-Stone & Swanson (1954). Foto: Incerlande Soares dos Santos.

➤ Exame direto a fresco

As amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal do animal e colocadas em tubos falcon descartáveis de 15 ml, com a identificação interna (IDI) do animal, sexo, número do lote e idade. Foram colocadas duas a três gotas de solução salina NaCl a 0,85% em uma lâmina de vidro. Com o uso da ponta de um

bastão de vidro, tocou-se em vários pontos das fezes, transferindo uma pequena porção para a lâmina de microscopia. As fezes foram espalhadas, fazendo um esfregaço da amostra e examinada ao microscópio, atentando-se para a espessura do esfregaço que não deveria impedir a passagem de luz (Figura 8).

A avaliação das lâminas confeccionadas pelos três métodos coproparasitológicos supracitados foi feita campo a campo, até que toda a área sob a lamínula tenha sido inspecionada, iniciando a análise em um dos cantos da lâmina e terminando no outro (da esquerda para a direita). A contagem foi feita com o uso de um contador de células, classificando a carga parasitária por meio de cruzes, conforme o anexo 6.

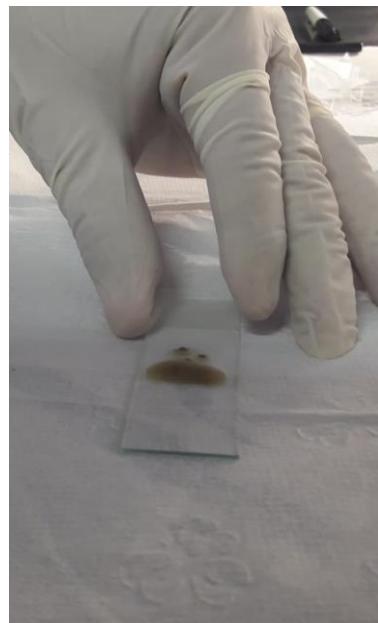


Figura 8: Exame direto a fresco. Foto: Incerlande Soares dos Santos.

5.4.2.1. Análise comparativa entre os três métodos coproparasitológicos adotados

Para comparar os três métodos parasitológicos adotados (Willis-Mollay, Denis & Stone e exame direto), visando detectar a melhor técnica de identificação para pesquisa de trofozoítos e pseudocistos de *T. muris*, foram coletadas quatro regiões do intestino do animal: intestino delgado inteiro, ceco, cólon e reto. As amostras,

devidamente separadas em placas de Petri e identificadas, foram processadas, conforme suas respectivas metodologias, sendo comparadas de forma quantitativa, representando as cargas parasitárias por cruzes (Anexo 6).

II – Delineamento experimental 2:

PESQUISA DO CICLO DE VIDA DE *T. muris*

A pesquisa do ciclo de vida de *T. muris* foi realizada nas dependências do Laboratório de Patologia da Reprodução, localizado no Anexo I do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

5.4.3. Cultivo in vitro

Após as amostras positivas serem identificadas nas três técnicas previamente utilizadas, os protozoários foram levados para serem cultivados *in vitro*.

Para este procedimento as amostras foram registradas no livro ata do laboratório, descrevendo: número das amostras, data de chegada do material, número de identificação, espécie e/ou linhagem do animal, a técnica realizada, os resultados e observações dignas de nota.

O processamento da amostra foi feito dentro da cabine de segurança biológica para os diferentes meios de cultivo. Os tubos contendo os meios foram identificados com os números das amostras e com a sigla Ha (= hamster). Com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável de 3 ml, foi adicionado 1 ml das fezes em cada tubo, contendo os meios sintéticos de enriquecimento, seletivos diferenciais, a saber: meio de Diamond's; caldo BHI (modificado); Hank's; LIT (liver infusion triptose); caldo peptonado; caldo tioglicolato; meio TCM 199; caldo Hayflick; caldo BHI (brain heart infusion) e PBS (phosphate buffered saline). Os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C, durante 24 horas, para verificar o crescimento de *T. muris*.

A avaliação do crescimento foi realizada às 12, 24 e 48 horas por meio de exame direto de uma gota do meio de cultivo em lâmina e observado em microscópio óptico Nikon Leitz®, com aumentos de 100x, 200x e 400x, evidenciando o crescimento ou não do protozoário. Quando ocorria crescimento, foram feitos os

repiques do cultivo de 12 em 12 horas para um meio novo. Os cultivos foram descartados a partir da constatação do crescimento após 48 horas de incubação, quando *T. muris* se transformou em pseudocisto e esgotou todo o nutriente contido no cultivo, o que culminou na morte do protozoário no meio sintético (Figura 9).

A partir dos cultivos realizados, foi possível avaliar a capacidade de *T. muris* de se adaptar nos diferentes meios empregados, identificando o(s) mais adequado(s) para o crescimento do protozoário.

A composição dos meios utilizados se encontra no anexo 7.

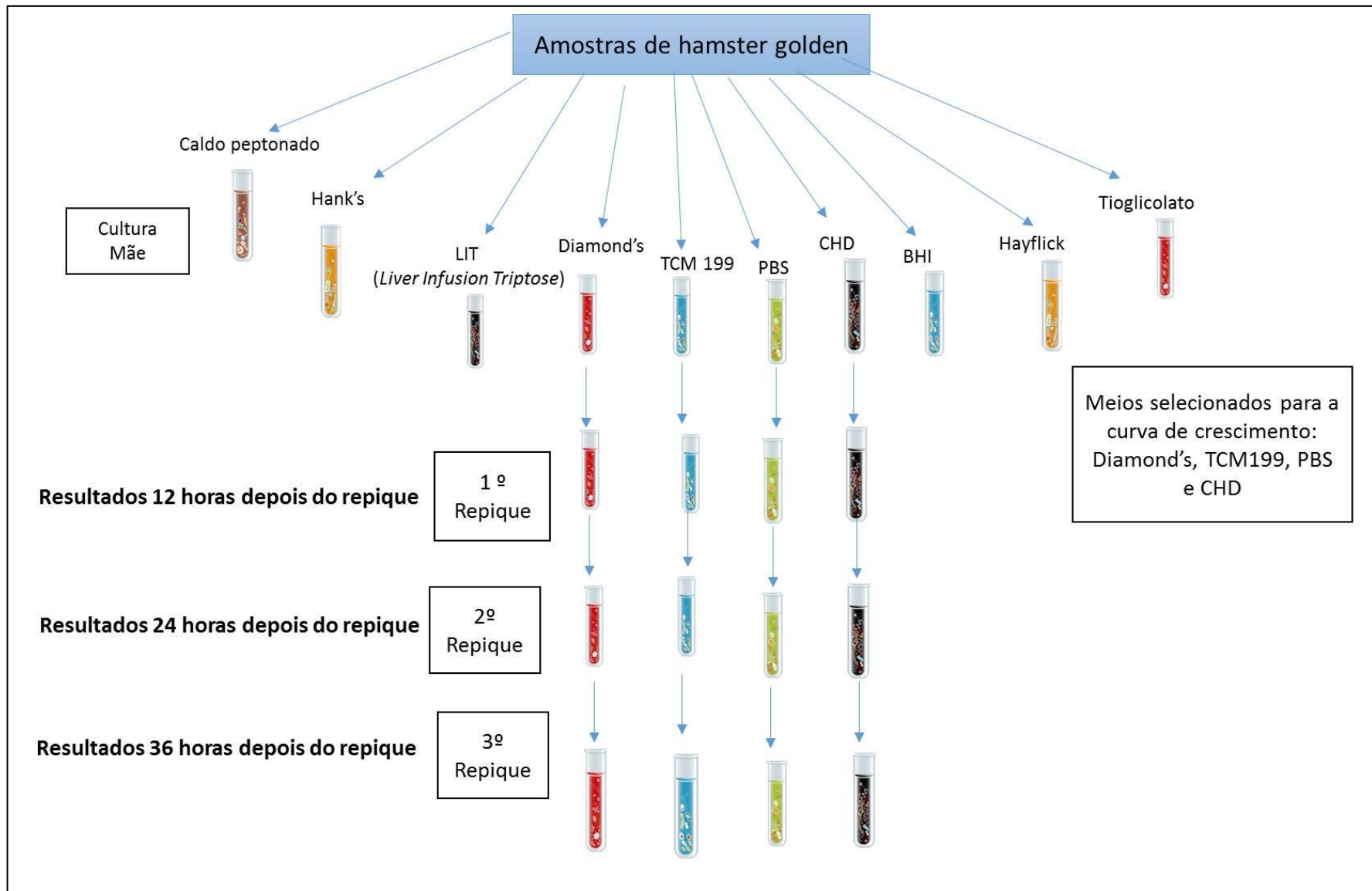


Figura 9: Cultivo de *Trichostrongylus axei* em meios sintéticos e passagens para novos meios. Fonte: Incerlande Soares dos Santos.

5.4.3.1. Curva de crescimento de *Tritrichomonas muris* em meios de cultivo sintéticos

O estudo da curva de crescimento de *T. muris* foi realizado no laboratório do SCQA (ICTB-Fiocruz). Dos dez meios sintéticos utilizados no procedimento de cultivo *in vitro*, foram selecionados quatro deles: TCM 199, Diamond's, Meio CHD e PBS, os quais demonstraram melhores resultados em termos de crescimento do parasito. A partir daí, foi feita uma análise do tempo de sobrevivência dos protozoários nas amostras biológicas, traçando uma curva de crescimento.

Primeiramente, coletou-se um fragmento de aproximadamente 5 cm do intestino grosso do animal *T. muris* positivo. A amostra foi macerada e homogeneizada em solução salina (NaCl) a 0,85%. Em seguida, cerca de 2 ml deste conteúdo intestinal foi filtrado com o auxílio de uma gaze estéril. Contabilizou-se, então, o número de células por diluição (1:1), apresentando $1,14 \times 10^7$ células/ml. Para conhecer a concentração de protozoários inicial, 10 µl foram retirados e diluídos em 10 µl do corante vital, eosina citrato, que permite diferenciar células viáveis (não coradas) de células mortas (coradas de vermelho). Após a diluição, 10 µl foram colocados em câmara de Neubauer e contados nos quatro quadrantes maiores, contendo 16 quadrados menores cada. O valor encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição da amostra e pelo fator de correção da câmara (10.000). Observou-se que houve concentração de trofozoítas de *T. muris* ($\times 10^5$ células/ml) e crescimento dos protozoários em todos os meios de cultivo no período de 0 a 66 horas. O número de protozoários presentes na amostra foi contabilizado em uma câmara de Neubauer, conforme contagem espermática (CBRA, 1998) (Figura 10).

De posse do conhecimento da concentração do agente, 20 µl da solução preparada foram colocadas em quatro tubos de 2,5 ml, contendo cada um 980 µl dos meios selecionados. Os tubos foram incubados em estufa a 34°C. Em diferentes momentos de incubação (0h, 3h, 6h, 24h, 30h, 48h, 51h e 66h), alíquotas de 10 µl foram sendo retiradas de cada tubo, e novas contagens foram sendo realizadas. O teste foi feito em duplicata, com três leituras por dia.

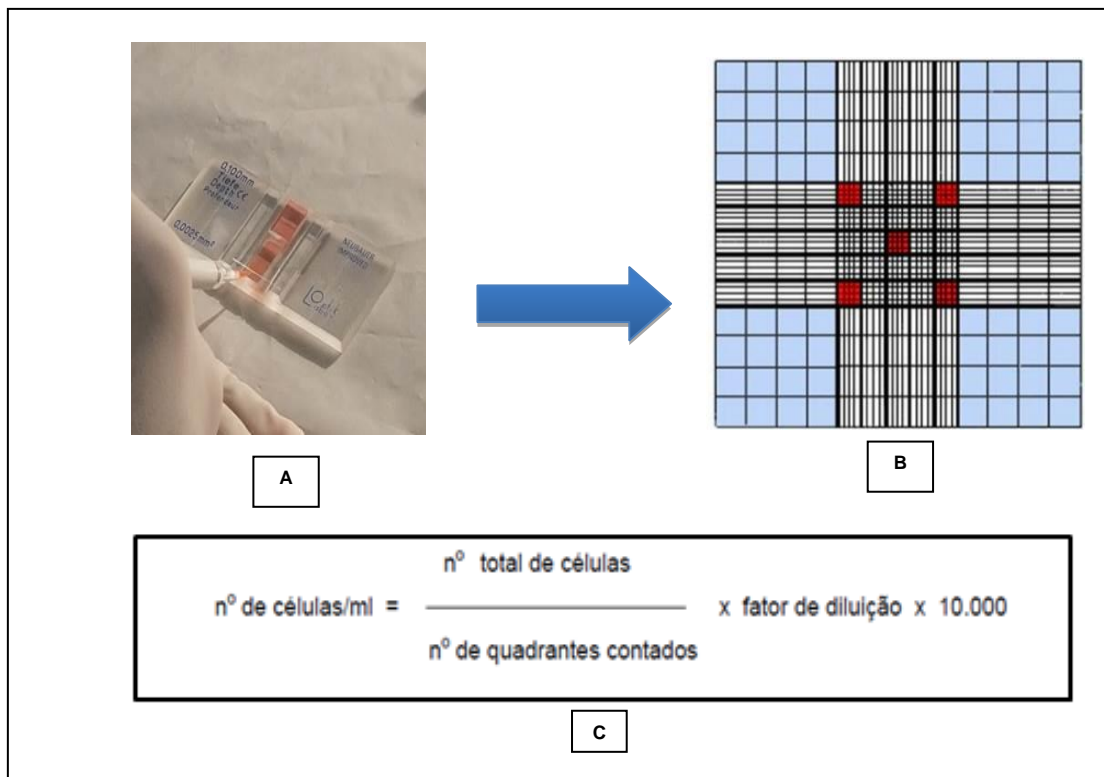


Figura 10: Contagem celular. **A:** Imagem ilustrativa da câmara de Neubauer; **B:** Quadrantes de contagem; **C:** Fórmula de cálculo da concentração, em número de células/ml.

5.4.3.2. Análise estatística

Para avaliar a existência de diferenças significativas dentro de cada tempo de cultivo *in vitro* dos diferentes meios sintéticos e dentro de cada bateria (repetição), foi realizada a análise de Variância (ANOVA), considerando 5% de probabilidade. Também foi realizada a análise descritiva de todos os meios de cultivo dentro de cada bateria. Foi realizada análise de Regressão Linear entre a carga parasitária em relação ao tempo. Para todas as análises, utilizou-se o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 20.0 (IBM Corp, NY, Estados Unidos).

III – Delineamento experimental 3:

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *T. muris*

O procedimento de caracterização morfológica do protozoário contemplado no delineamento experimental 3, foi desenvolvido em três laboratórios. A avaliação morfotintorial foi realizada nos laboratórios da UFRRJ e do SCQA (ICTB-Fiocruz). Já a análise ultraestrutural foi feita no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz).

5.4.4. Diagnóstico morfológico

5.4.4.1. Avaliação morfotintorial

Para a avaliação morfotintorial das formas evolutivas de *T. muris*, foram confeccionadas 50 lâminas (26x76) de todos os animais estudados a partir do cultivo de protozoários nos meios sintéticos que se adaptaram melhor ao protozoário: Diamond's, CHD, meio 199 e PBS.

Com 10 µL da suspensão do cultivo, confeccionando um esfregaço delgado, com movimentos circulares, utilizando uma alça de platina, deixando-se secar ao ar. As lâminas foram coradas pelos métodos de Panótico rápido e Giemsa 5% descritos a seguir. A observação das estruturas foi feita com o uso do microscópio óptico, com aumento de 1.000x (Figura 11).

➤ Coloração por Panótico Rápido

Foi retirada uma alíquota de cada meio de cultivo, dispensando uma gota da mesma sobre uma lâmina de vidro, estendendo-a com auxílio da pipeta diretamente na lâmina. Assim, foram preparadas as lâminas da mucosa intestinal, deixando-as secar em temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas passaram por três soluções de reagentes:

- Reagente nº1: composto por uma solução de triarilmetano a 0,1%;
- Reagente nº 2: composto por uma solução de xantenos a 0,1%;

- Reagente nº 3: composto por uma solução de tiazinas a 0,1%.

Os três reagentes foram dispostos em três recipientes distintos, seguindo as recomendações do fabricante (Laborclin®). As lâminas foram submersas nas três soluções, permanecendo por um segundo em cada uma delas, mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo durante cinco segundos e deixando escorrer bem. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente, secadas em temperatura ambiente na posição vertical e com o final da extensão voltado para cima.

➤ Coloração por Giemsa 5%

Foi retirada uma alíquota de cada meio de cultivo e com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável graduada de 3ml, foi feito o esfregaço das amostras, estendendo-a com auxílio da pipeta diretamente na lâmina. O esfregaço foi fixado com 15 a 20 gotas de metanol por dois minutos. Após, escoou-se o metanol e, sem lavar ou deixar secar, cobriu-se a lâmina com solução de Giemsa (aproximadamente 5ml). Prosseguiu-se com a coloração por 10 minutos e, em seguida, lavada em água corrente, deixando-a secar em posição vertical.

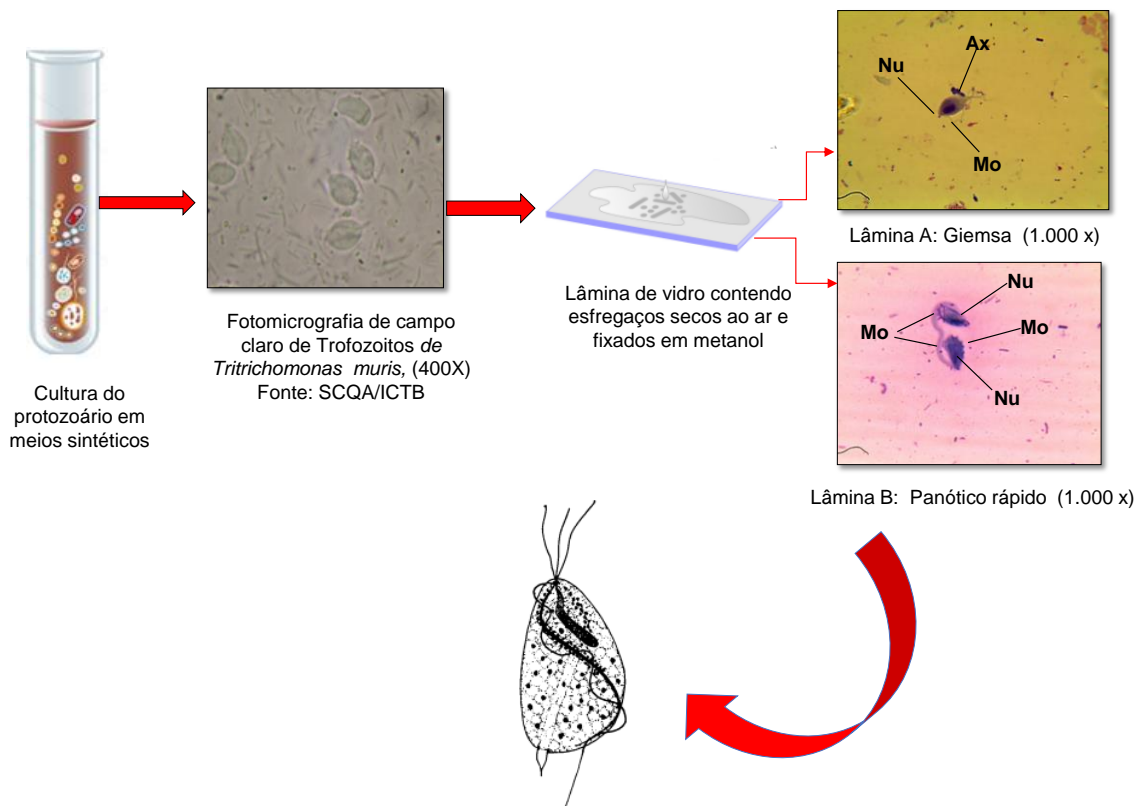


Figura 11: Aspecto morfotintorial de *Trichomonas muris* em lâminas para pesquisa de morfologia. Fonte: Incerlande Soares dos Santos.

5.4.5. Microscopia eletrônica das amostras biológicas

Conforme já mencionado, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de *T. muris* no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz) e as análises de microscopia eletrônica (ME) foram realizadas pela Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf do IOC-Fiocruz, RJ.

5.4.5.1. Processamento para MEV

As amostras da mucosa intestinal e fezes formadas foram centrifugadas *in natura* (16.000 xg/ 3 minutos), em seguida, o sedimento foi fixado com glutaraldeído 2,5% acrescido de 0,1M, tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 contendo 3,5% de

sacarose, por 1h a 4°C. Após esse tempo, os parasitos foram lavados no mesmo tampão e pós-fixados por 1h a 4°C com 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄), diluído em 0,1M tampão cacodilato de sódio - pH 7,2, contendo 1% ferricianeto de potássio. Após a pós-fixação, os parasitos foram lavados em 0,1M tampão cacodilato de sódio - pH 7,2 e aderidos em lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina, onde permaneceram por 24h. As lamínulas foram lavadas em 0,1M tampão cacodilato de sódio - pH 7,2 para retirar as células que não aderiram e os parasitos desidratados em série de etanol: a saber 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (2X). Os parasitos foram secos pelo método do ponto crítico do CO₂ (aparelho Autosomdei 815/Jeol[®]) e, posteriormente, as lamínulas contendo os parasitos aderidos foram montadas em suportes metálicos apropriados para serem revestidas por uma fina camada (25nm) de ouro (Cressington 108 - TED PELLA[®]). Por fim, os parasitos foram observados ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM-6390-LV), Plataforma de ME Rudolf (IOC-Fiocruz).

5.4.5.2. Processamento para MET

As amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% por 1h a 4°C, acrescidas de 0,1M em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose e após lavados por (3X) no mesmo tampão. Em seguida, foram pós-fixadas por 1h a 4°C com uma solução de 1% OsO₄ e 0.8% de ferricianeto de potássio, diluídos em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2 com 3,5% de sacarose e após lavadas (3X) no mesmo tampão, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, as células foram desidratadas em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) a 4° C por 10 minutos em cada etapa. A etapa de 100% foi repetida por 3 vezes para garantir que toda a água tenha sido removida. As amostras foram infiltradas em resina PolyBed 812 (epon) na proporção de 1:1 acetona 100% epon; overnight a 4°C e, em seguida, por 4h a temperatura ambiente em epon puro. As amostras foram transferidas para os moldes e colocadas na resina e os blocos identificados. A polimerização foi feita entre 60°C-70°C em forno de polimerização, por 72h. Após a polimerização, foram realizados cortes ultrafinos no ultramicrotomo (Leica M 80), recolhidos em grades de cobre de 300 mesh, contrastados com 5% de acetato de uranila e 1% de citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de

transmissão (Jeol JEM-1011[®]) pertencente à Plataforma de ME Rudolf (IOC-Fiocruz).

5.5. Estudo retrospectivo das enteroparasitoses diagnosticadas em hamsters golden

Foi realizado no período de 2005 a 2018 um levantamento parasitológico a partir dos dados brutos extraídos do monitoramento sanitário da criação de hamsters golden. Com os dados obtidos dos exames coproparasitológicos fornecidos pelo SCQA (ICTB-Fiocruz), fez-se um gráfico para visualização da prevalência de *T. muris* durante o período estudado.

5.6. Registro fotográfico

Foram feitas fotomicrografias das imagens das lâminas de coloração, das análises a fresco da mucosa intestinal e dos cultivos *in vitro*. O registro foi feito com o auxílio de uma câmera digital Axio CamERc-5s[®], acoplada ao microscópio. Para análise da microscopia digital foi utilizado o software AxionVision Release[®], versão 4.8.2, 2010.

As lâminas a fresco e de coloração foram preparadas conforme descrito nos itens 5.4.1 e 5.4.4, respectivamente. Para as fotografias dos cultivos, instilou-se uma gota do meio em uma lâmina com uma lamínula sobreposta.

Os registros foram feitos nas lâminas nos aumentos de 10X, 20X e 40X.

6. RESULTADOS

6.1. Exame da mucosa intestinal por necropsia

De um total de 50 amostras, detectou-se um índice de 100% de prevalência do protozoário *T. muris* pelo método direto, evidenciando a forma de trofozoíto, conforme a figura 12.

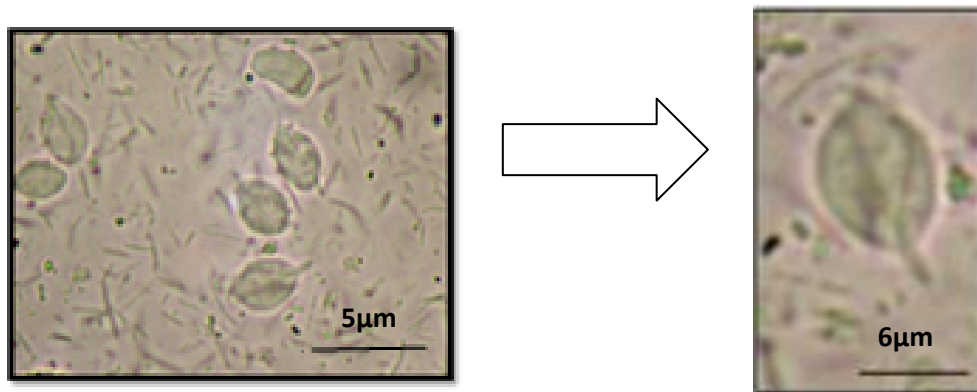


Figura 12: Fotomicrografia de campo claro de trofozoítos de *Trichostrongylus muris* (400X) pelo método direto. Foto: Incerlande Soares dos Santos.

6.2. Exames coproparasitológicos da mucosa intestinal e das fezes formadas

A carga parasitária encontrada nas quatro regiões intestinais analisadas dos animais são demonstradas no quadro 2. Das 50 amostras intestinais analisadas pelos três métodos parasitológicos (direto, Dennis-Stone & Swanson e Willis-Mollay), foram obtidos os seguintes resultados por fragmento:

- Intestino delgado: encontrados apenas trofozoítos de *T. muris*, sendo 50 animais positivos (100%) pelo método direto; 30 animais positivos (60%) por Dennis-Stone & Swanson e 10 animais positivos (20%) por Willis-Mollay;

- Ceco: encontrados trofozoítos de *T. muris*, sendo 50 animais positivos (100%) pelo método direto; 40 animais positivos (80%) por Dennis-Stone & Swanson e 15 animais positivos (30%) por Willis-Mollay;
- Cólon: encontrados trofozoítos de *T. muris*, sendo 50 animais positivos (100%) pelo método direto; 15 animais positivos (60%) por Dennis-Stone & Swanson e 15 animais positivos (30%) por Willis-Mollay;
- Reto: encontrados pseudocistos de *T. muris*, sendo 50 animais positivos (100%) pelo método direto; 30 animais positivos (60%) por Dennis-Stone & Swanson e 20 animais positivos (40%) por Willis-Mollay.

As figuras 13 e 14 mostram as formas de trofozoítos e pseudocistos encontradas nas amostras analisadas.

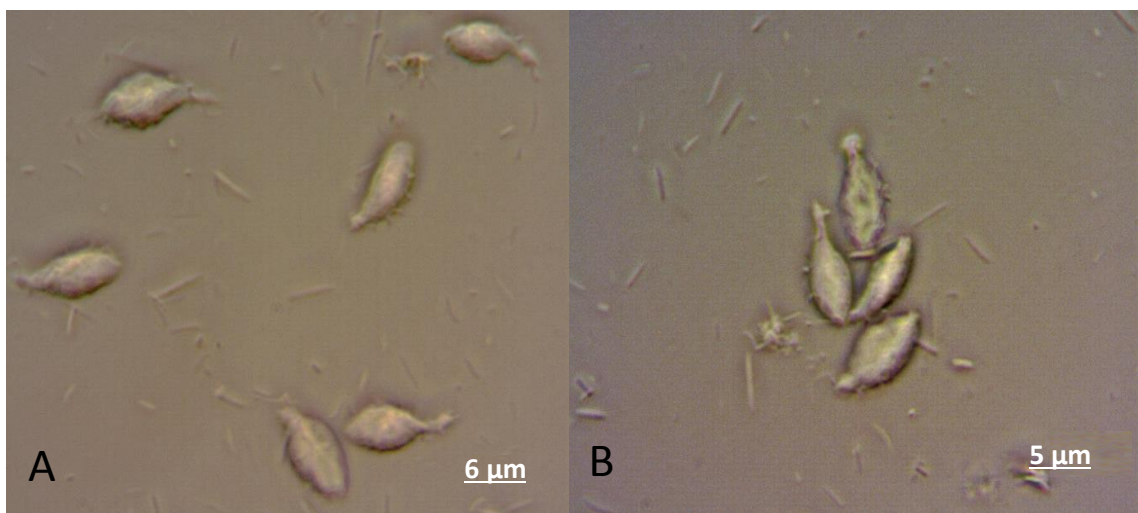


Figura 13: Trofozoítos de *Trichostrongylus muris* encontrados na mucosa intestinal de hamster golden, pelo método direto. **A:** 6 µm; **B:** 5 µm.

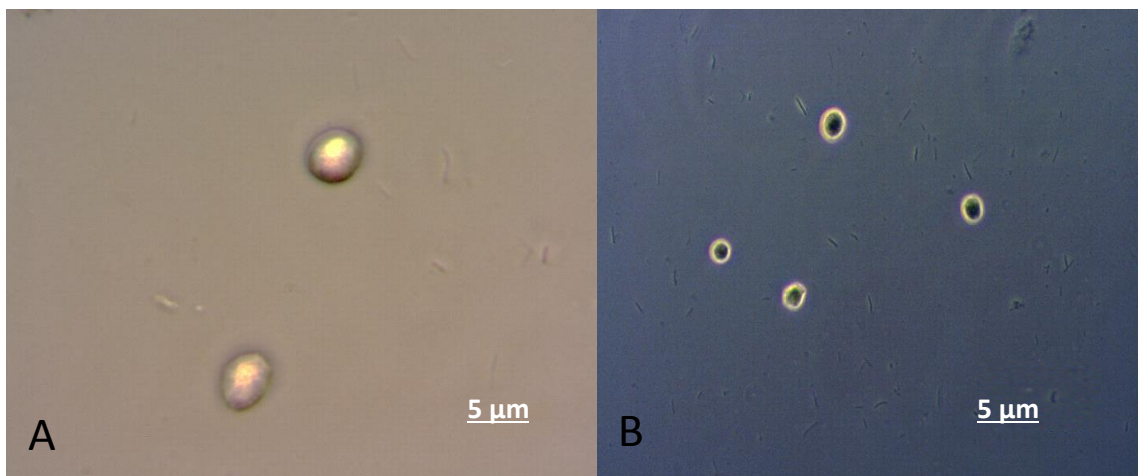


Figura 14: Pseudocistos de *T. muris* encontrados em fezes formadas de hamster golden, pelo método direto. **A:** 5 µm; **B:** 5 µm.

Quadro 2: Carga parasitária encontrada nas regiões intestinais dos hamsters golden (*Mesocricetus auratus*) analisados

REGIÃO INTESTINAL EXAMINADA	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA					
	Exame direto		Dennis-Stone & Swanson		Willis-Mollay	
	Trofozoíto	Pseudocisto	Trofozoíto	Pseudocisto	Trofozoíto	Pseudocisto
Intestino delgado	+++	ausente	+++	ausente	ausente	+++
Ceco	+++	ausente	+++	ausente	ausente	+++
Cólon	+++	ausente	+++	ausente	ausente	+++
Reto	ausente	+++	ausente	+++	ausente	+++

+ 1-100; ++ 101-300; +++ >301 – Fonte: Incerlande Sores dos Santos

A figura 15 demonstra o resultado comparativo entre as técnicas parasitológicas.

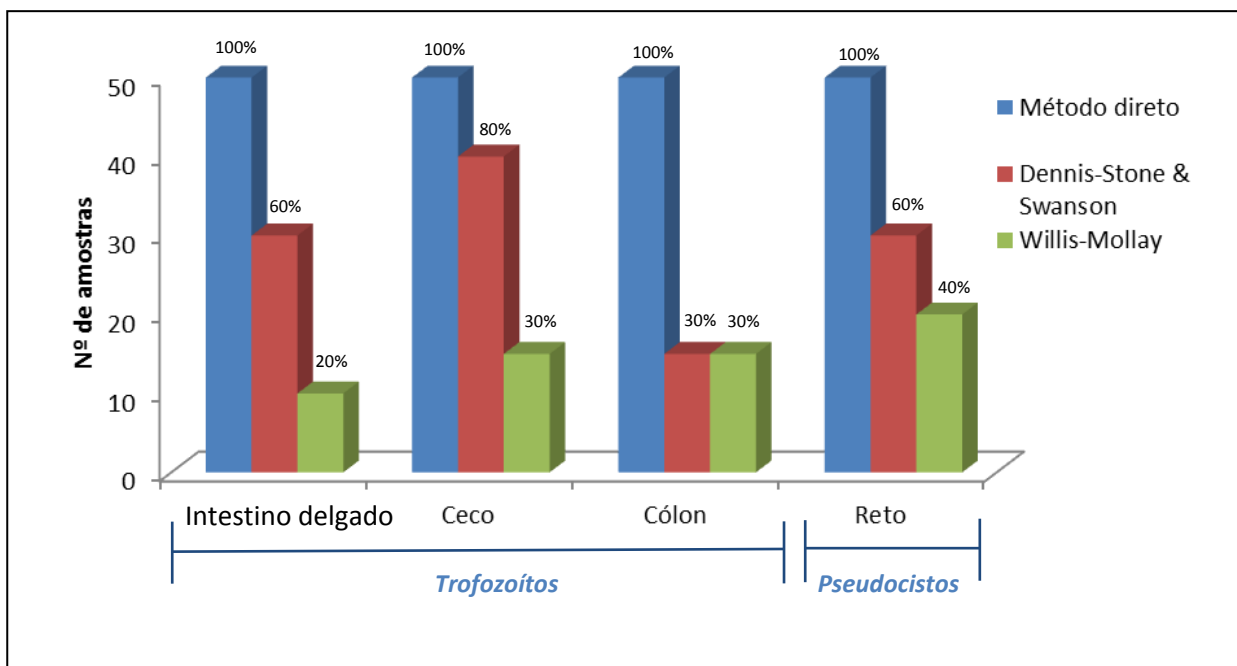


Figura 15: Análise comparativa entre três métodos coproparasitológicos a partir de diferentes regiões intestinais de hamsters golden (*Mesocricetus auratus*) para pesquisa de *Tritrichomonas muris*.

6.3. Cultivo de *Tritrichomas muris in vitro*

Para ajustar a concentração inicial da cultura e identificar a temperatura ideal de crescimento do agente, foi realizado um total de nove baterias com os dez meios de cultivo selecionados. Uma vez identificados os melhores meios de cultivo para esta análise, foi então feito o ajuste da concentração da cultura, partindo todos os meios com o mesmo valor.

O quadro 3 descreve os resultados dos cultivos *in vitro* para pesquisa de *T. muris* a partir de amostras fecais de hamsters golden procedentes do ICTB-Fiocruz.

Quadro 3: Cultivos *in vitro* para pesquisa de *Tritrichomonas muris* a partir de amostras fecais de hamsters golden (*Mesocricetus auratus*)

Bateria / Monitoramento sanitário (data)		Amostras biológicas (Identificação)	Meio	Repique	Tempo de análise	Resultado
Primeira bateria de cultivo	20/02/2017	Fezes com salina NaCl 0,85% Identificação: 1, 2, 3 e 4	Caldo peptonado, Hanks e Diamond's	Não houve	24 horas	Não houve crescimento de <i>T. muris</i> . Todas as amostras foram <i>T. muris</i> positivas por aceleração do metabolismo e esgotamento dos nutrientes. A avaliação ocorreu por uma fase de adaptação celular ao meio de cultivo, conhecida como fase <i>Lag</i> (LONGHI, 2012).
Segunda bateria de cultivo	24/04/2017	Fezes com salina NaCl 0,85% Identificação: 5, 6, 7 e 8	Caldo peptonado, Hank's, Diamond's e CHD	Não houve	24 horas	Houve crescimento de <i>T. muris</i> em todos os meios utilizados. Os parasitos foram perdendo o movimento e se transformando em pseudocisto, culminando com a morte de todos.
Terceira bateria de cultivo	20/07/2017	Fezes com salina NaCl 0,85% Identificação: 9, 10, 11 e 12	Caldo peptonado, Hank's, Diamond's e PBS	Não houve	24 horas	Houve crescimento de <i>T. muris</i> em todos os meios utilizados em 12 horas e 24 horas os meios Diamond's e PBS. Os parasitos foram perdendo o movimento e se transformando em pseudocistos, culminando na morte.

Bateria / Monitoramento sanitário (data)		Amostras biológicas (Identificação)	Meio	Repique	Tempo de análise	Resultado
Quarta bateria de cultivo	21/09/2017	Fezes com salina NaCl 0,85% <i>e in natura</i> Identificação: 13, 14, 15 e 16	Caldo peptonado, Hank's, Diamond's e TCM 199	Houve repique	24 horas	Houve crescimento de <i>T. muris</i> em todos os meios utilizados. Os parasitos foram perdendo o movimento e se transformando em pseudocisto, culminando na morte de todos, com exceção do meio TCM 199, no qual <i>Tritrichomonas</i> permaneceram vivos após 24 horas. Onde foram repicado para novo meio de cultivo e permaneceram em multiplicação por 36 horas.
Quinta bateria de cultivo	12/02/2018	Fezes com salina NaCl 0,85% <i>e in natura</i> Identificação: 17, 18, 19 e 20	Caldo peptonado, Hank's, Diamond's e TCM 199	Não houve	24 horas	Não houve crescimento de <i>T. muris</i> em nenhum dos meios. Por aceleração do metabolismo e esgotamento dos nutrientes, todas as amostras foram consideradas positivas para <i>T. muris</i> .
Sexta bateria de cultivo	09/04/2018	Fezes com salina NaCl 0,85% <i>e in natura</i> Identificação: 21, 22, 23, 24, 25 e 26	Caldo peptonado, Hank's, Diamond's, tioglicolato, TCM 199 e Hayflick	Não houve	24 horas	Houve crescimento de <i>T. muris</i> em todos os meios utilizados. Os parasitos foram perdendo o movimento após 24 horas e foram se transformando em pseudocistos, culminando coma morte de todos, com exceção do meio TCM 199, no qual <i>T. muris</i> permaneceram vivos após 24 horas. Foram realizados repiques a partir do meio TCM 199 para verificar o crescimento dos protozoários no decorrer do período de 36 horas.

Bateria / Monitoramento sanitário (data)		Amostras biológicas (Identificação)	Meio	Repique	Tempo de análise	Resultado
Sétima bateria de cultivo	07/08/2018	Fezes com salina NaCl 0,85% <i>e in natura</i> Identificação: 27, 28, 29, 30, 31 e 32	Caldo peptonado, Hank's, Diamond's, Tioglicolato, TCM 199 e Hayflick	Houve repique	24 horas	Houve crescimento de <i>T. muris</i> em todos os meios utilizados. Os parasitos foram perdendo o movimento após 24 horas e foram se transformando em pseudocistos, culminando com a morte de todos, com exceção do meio TCM 199, no qual <i>T. muris</i> permaneceram vivos após 24 horas. Foram realizados repiques a partir do meio TCM 199 para verificar o crescimento dos protozoários no do período de 36 horas.
Oitava bateria de cultivo	15/10/2018	Fezes com salina NaCl 0,85% <i>e in natura</i> Identificação: 33, 34, 35 e 36	Caldo peptonado, Diamond's, TCM 199 e BHI	Não houve	24 horas	Houve crescimento de <i>T. muris</i> em todos os meios utilizados. Os parasitos foram perdendo o movimento após 24 horas e foram se transformando em pseudocistos, culminando com a morte de todos, com exceção do meio TCM 199, no qual os protozoários da espécie <i>T. muris</i> permaneceram vivos após 24 horas. Foram realizados repiques a partir do meio TCM 199 para verificar o crescimento dos parasitos no decorrer do período 36 horas.

Bateria / monitoramento sanitário (data)		Amostras biológicas (Identificação)	Meio	Repique	Tempo de análise	Resultado
Nona bateria de cultivo		Fezes com salina NaCl 0,85% e in natura Identificação: 37, 38, 39, 40 e 41	Diamond's, BHI, Hank's, LIT e PBS	Não houve	24 horas	Houve crescimento 5 horas após o cultivo de <i>T. muris</i> no meio de Diamond's; ii) Todos os outros cultivos apresentaram inúmeros pseudocistos e alguns trofozoítos; iii) As amostras que cresceram no caldo peptonado em 12 horas, foram repicadas para o meio de Diamond's; iv) Foram detectados pseudocistos e poucos protozoários móveis no cultivo em LIT; v) Crescimento no caldo de BHI (modificado) em algumas amostras; vi) Meios Hank's e Diamond's: crescimento favorável em todas as amostras, com pequena presença de pseudocistos e vários protozoários móveis; vii) Não ocorreu crescimento de <i>T. muris</i> em PBS.

Nota: A aceleração do metabolismo foi avaliada através da mudança de coloração dos meios de cultivo.

6.3.1. Curva de crescimento

Com base no número de animais analisados, os resultados mostraram uma incidência de 100% do protozoário estudado. Os valores das concentrações encontrados foram plotados graficamente (Figura 16), sendo possível observar que a concentração de células cresceu rapidamente nas primeiras horas de cultivo, independente do meio utilizado, atingindo o pico de crescimento com 3 horas de incubação. Posteriormente, uma fase de declínio rápido foi observada; e com 18 horas de incubação, percebeu-se uma fase de adaptação, quando então a concentração de células permaneceu constante até as 66 horas. Um novo declínio no número de células foi observado com 18 horas, e nos momentos seguintes não houve mais células viáveis. O quadro 4 mostra a concentração de trofozoítos de *T. muris* ($\times 10^5$ células/ml) nos meios de cultivo em diferentes tempos (0h, 3h, 6h, 24h, 30h, 36h 51 e 66h).

Apesar do perfil de crescimento dos protozoários ter sido semelhante nos diferentes meios utilizados, constatou-se que os cultivos apresentaram maior concentração de células por ml no meio de Diamond's em todos os tempos avaliados, comparado com os demais meios. Após 3 horas de cultivo, a fase de declínio foi mais lenta e a sobrevivência neste meio foi prolongada, uma vez que este foi o único meio que ainda apresentou células viáveis após 66 horas.

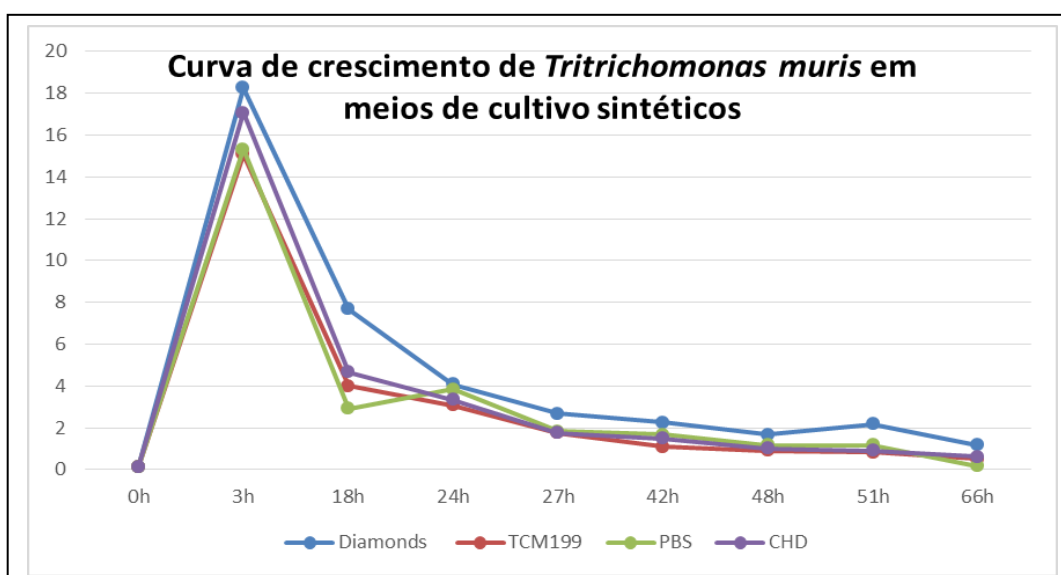


Figura 16: Concentração das células de *Tritrichomonas muris* isoladas das fezes de hamster golden, a cada 3 horas, cultivadas nos meios de cultivo Diamond's, PBS, TCM199 e CHD.

Quadro 4: Concentração de trofozoítos de *Tritrichomonas muris* ($\times 10^5$ células/ml) em diferentes meios de cultivo

Meios de cultivo	0h	3h	18h	24h	27h	42h	48h	51h	66h
Diamond's	0,118	18,25 ^a	7,67	4,08	2,67	2,25	1,67	2,166667	1,166667
PBS	0,118	15,08	4,00	3,08	1,75	1,08	0,92	0,833333	0,5
199	0,118	15,33	2,92	3,83	1,83	1,67	1,17	1,166667	0,166667
CHD	0,118	17,08	4,67	3,33	1,75	1,50	1,00	0,916667	0,611111 ^b

^aConcentração mais elevada de trofozoítos; ^bmenor concentração de trofozoítos

6.3.1.1. Análise estatística

Não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os meios de cultivo ($p > 0,05$) e as análises descritivas demonstraram que na quinta bateria houve uma maior padronização dos dados: concentração de $0,118 \times 10^5$ células/ml e temperatura de 34°C o crescimento de *T. muris*. Sendo assim, selecionou-se o gráfico mais representativo para a demonstração da tendência dos dados, no qual pode ser observado que o meio Diamond's foi o que apresentou maiores valores. Além disso, é possível observar um pico da carga parasitária no tempo de 3 horas, com declínio substancial após este tempo, alcançando próximo a zero no tempo de 66 horas para todos os meios de cultivo.

A equação da regressão linear estimada foi $y = 8.0833 - 0.9282x$ e $R^2 = 0.2291$, a qual foi significativa ($p < 0,05$), sendo y o número de parasitos e x o tempo (Figura 17).

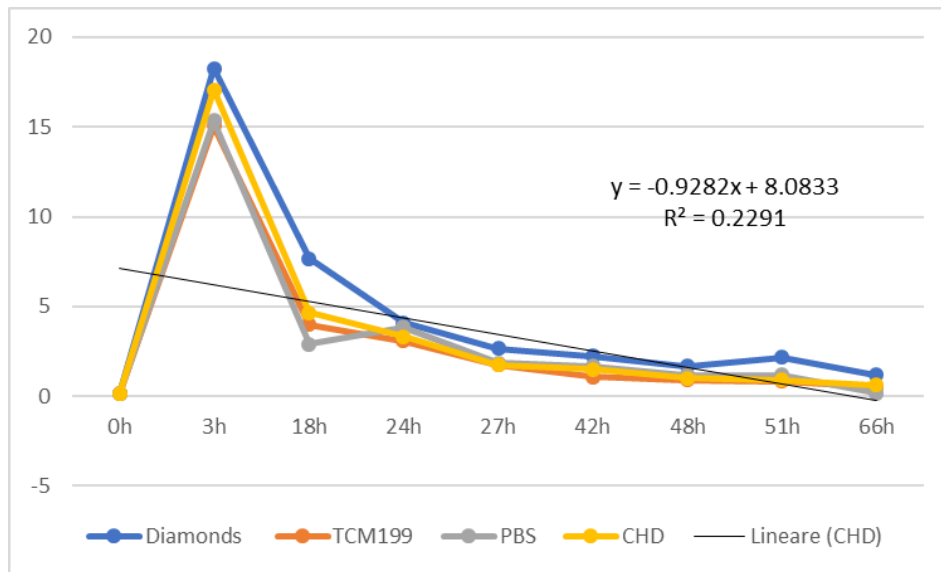


Figura 17: Curva de crescimento de *Tritrichomonas muris* de hamsters golden em diferentes meios de cultivo (Diamond's, TCM199, PBS e CHD). A equação da regressão linear mostra o número de trofozoítos de *T. muris* x tempo.

6.4. Avaliação morfotintorial

O exame microscópico possibilitou visualizar as diferentes formas e estruturas do protozoário e enumerar os seus flagelos. Foram observados parasitos de formato que variou de piriforme a arredondado e os flagelos foram realçados nas preparações de esfregaço úmido. As organelas visualizadas de *T. muris* por meio das análises morfotintoriais pelas colorações de Panótico rápido e Giemsa são demonstradas no quadro 4, comparando as identificações em percentual. As figuras 18 e 19 mostram *T. muris* identificado pelas técnicas mencionadas.

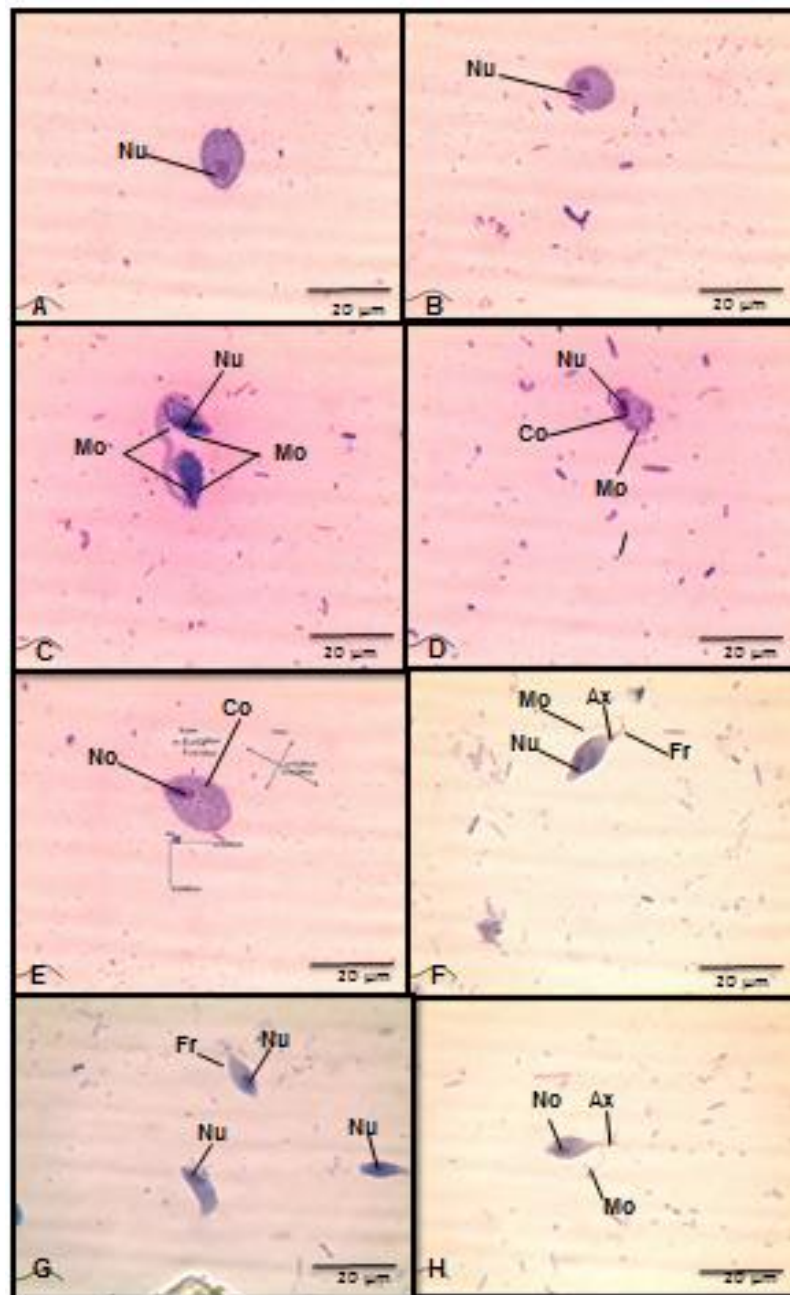


Figura 18: Análise morfotintorial de *Tritrichomonas muris* a partir de amostras fecais de hamsters golden (*Mesocricetus auratus*) pela coloração de Panótico® rápido. **A e B:** Pseudocisto de *T. muris* em formato típico, apresentando núcleo (Nu) e forma arredondada, aumento 100X (Barra= 20µm); **C:** Parasito de formato piriforme com Nu com evidência e membrana ondulante (Mo), aumento 100X (Barra= 20µm); **D:** Protozoário de formato piriforme com Nu com evidência e Mo, aumento 100X (Barra= 20µm); **E:** Pseudocisto com Nu em evidência e Costa (Co), aumento 100X (Barra= 20µm); **F:** Protozoário de formato piriforme com Nu, flagelos recorrentes (Fr), Axóstilo (Ax) e Mo, aumento 100X (Barra= 20µm); **G:** Protozoário de formato piriforme com Nu, Fr em evidência, aumento 100X (Barra=

20µm); H: Trofozoíto com Nu e membrana ondulante e Ax em evidência, aumento 100X (Barra= 20µm). Foto: Incerlande Soares dos Santos.

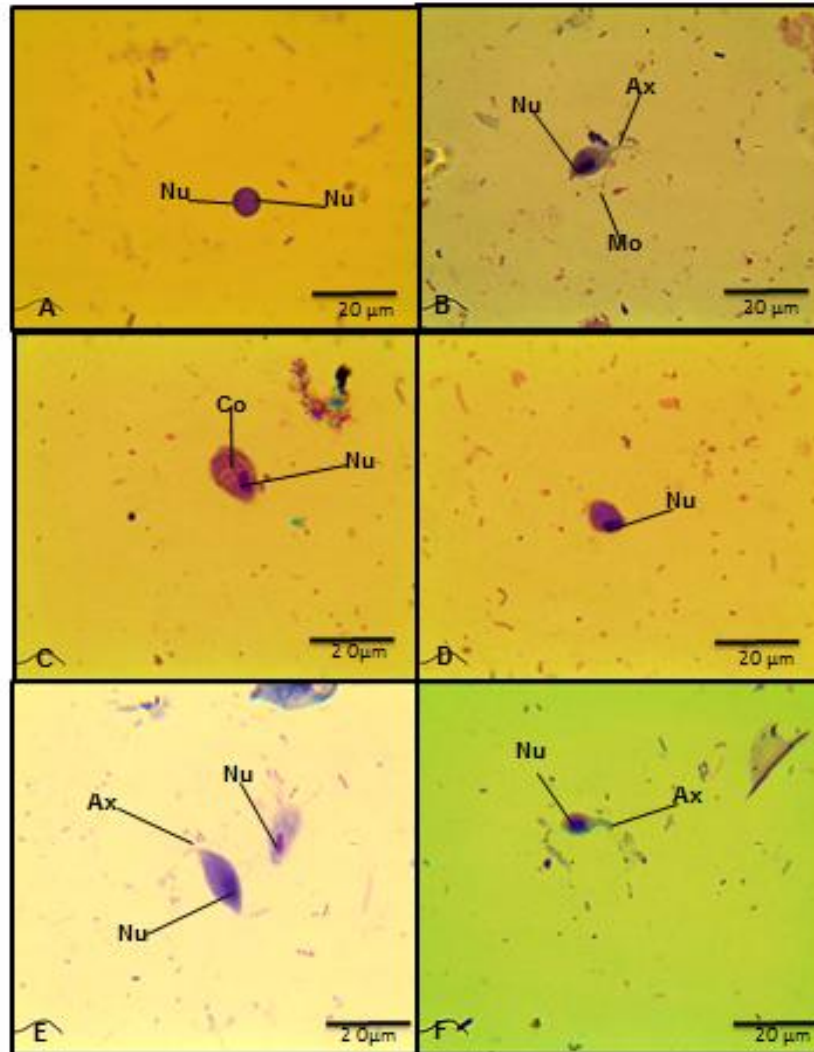


Figura 19: Análise morfotintorial de *Tritrichomonas muris* em hamster golden (*Mesocricetus auratus*) por coloração de Giemsa®. **A:** Pseudocisto de *T. muris* em forma arredondada, apresentando dois núcleos (Nu) em cada extremidade, aumento 100X (Barra= 20µm); **B:** Trofozoíto de *T. muris* em forma piriforme, apresentando um núcleo (Nu), membrana ondulante (Mo) e Axóstilo (Ax), aumento 100X (Barra= 20µm); **C e D:** Presença de dois pseudocistos de *T. muris* em forma arredondada com um Nu, aumento 100X (Barra= 20µm); **E:** Presença de dois trofozoítos em forma piriforme, com Nu e Ax, aumento 100X (Barra= 20µm); **F:** Trofozoíto em forma piriforme com um Nu e Ax em evidência, aumento 100X (Barra= 20µm). Foto: Incerlande Soares dos Santos.

Comparando-se as duas técnicas de coloração adotadas, Panótico rápido x Giemsa (quadro 5), através da análise de variância, observou-se que não há diferença significativa entre as colorações ($p=0,809$), constatando-se, portanto, que ambos os métodos permitem uma boa visualização do protozoário.

Observou-se que o formato piriforme de *T. muris* foi mais evidente pela coloração de Giemsa (84,2%); nesta técnica também se evidenciou a membrana ondulante com maior nitidez.

Em contrapartida, os flagelos anteriores e o recorrente ficaram mais evidentes pela técnica do Panótico rápido, permitindo melhor diferenciação.

Quadro 5: Comparação das colorações de Panótico x Giemsa para identificação de *Tritrichomonas muris*

Panótico	Estruturas observadas (%)	Giemsa	Estruturas observadas (%)
Núcleo	100,0	Núcleo	100,0
Membrana Ondulante	25,0	Membrana Ondulante	64,9
Costa	40,4	Costa	59,6
Flagelos anteriores	15,4	Flagelos anteriores	8,7
Flagelo Recorrente	34,6	Flagelo Recorrente	29,8
Axóstilo	57,7	Axóstilo	17,5
Formato Piriforme	50,0	Formato Piriforme	84,2
Formato Ovoide	50,0	Formato Ovoide	15,8
Hidrogenossomas	34,6	Hidrogenossomas	19,3

6.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Tritrichomonas muris*

A análise do *T. muris* em hamsters golden por MEV possibilitou identificar as principais ultraestruturas presentes no parasito, detalhando minuciosamente as suas características morfológicas.

Os trofozoítos foram encontrados na mucosa intestinal e apresentaram formato piriforme, exibindo morfologia típica da família *Tritrichomonadidae*. Foram evidenciados três flagelos anteriores e membrana ondulante, percorrendo todo o corpo do parasito até a porção final; e um flagelo recorrente, continuando além da membrana ondulante em uma porção livre. A membrana ondulante apresenta 3 a 4 ondulações em uma estrutura única formada pelo flagelo posterior ligado ao corpo por uma fina camada de membrana plasmática (Figura 20).

A parte posterior do axóstilo apresentou sua projeção mais espessa logo na emergência do corpo, tornando-se mais delgada na porção final, semelhante a um filete e de diâmetro semelhante ao flagelo posterior (Figura 21). A costa não foi visualizada na MEV.

Já na figura 22 é possível ter uma visão geral de vários tamanhos de pseudocistos de *T. muris* por MEV.

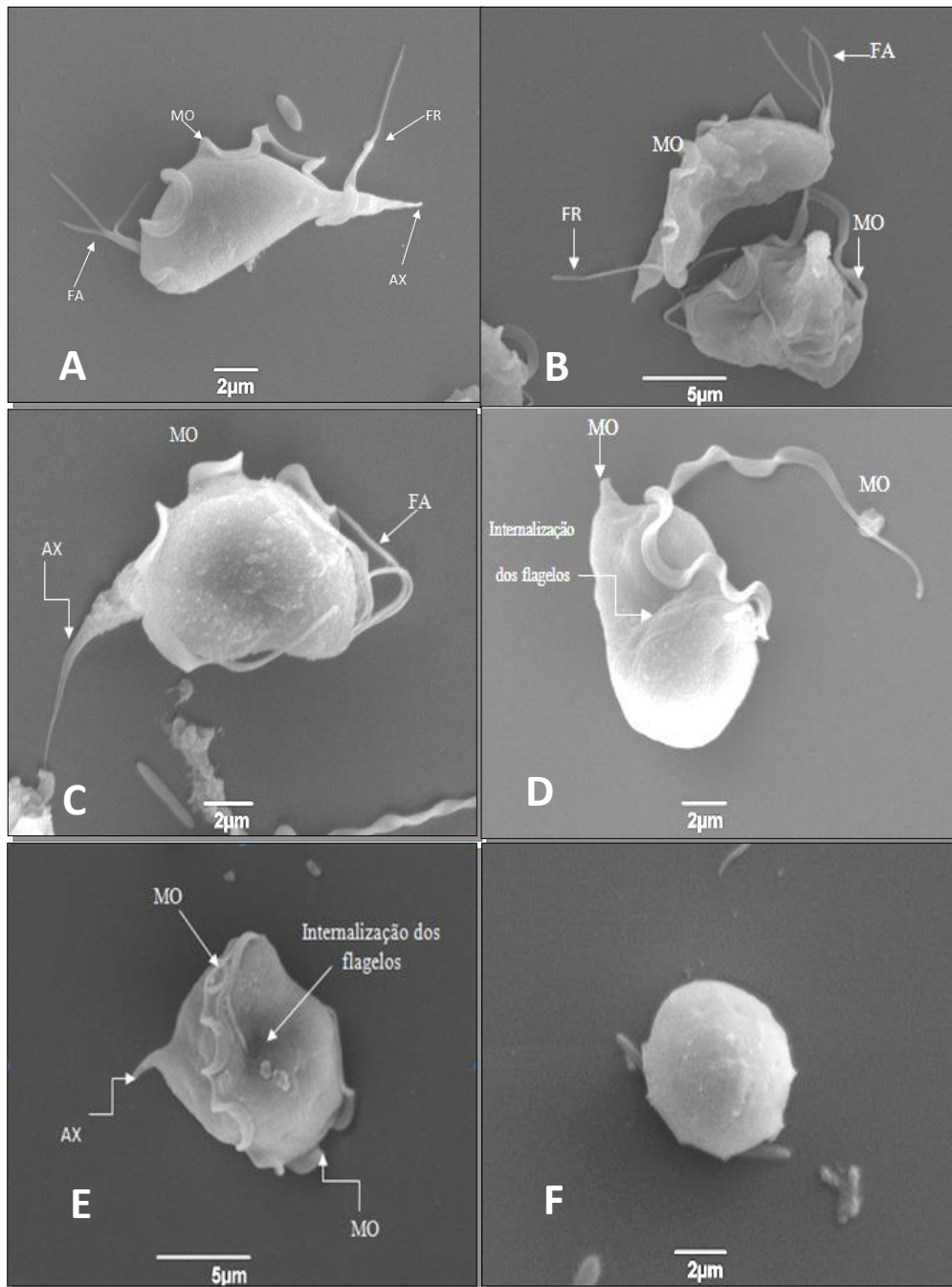


Figura 20: *Tritrichomonas muris* em amostra da mucosa intestinal de hamster golden. **A:** Trofozoíto em forma piriforme. Em destaque, estruturas como o axóstilo (Ax) (ponta da seta), membrana ondulante (Mo), flagelo recorrente (Fr) em evidência e três dos flagelos anteriores (Fa); **B:** Divisão binária, destacando estruturas de três dos Fa e do Fr, observa-se também a membrana ondulante (Mo); **C:** Visão geral da forma piriforme. **D:** Transformação da forma piriforme em pseudocisto, internalizando os Fr e a Mo; **E:** Transformação de trofozoíto de *T. muris* da forma piriforme em pseudocisto. Em destaque a internalização dos Fa, estrutura três dos Fr, observa-se a Mo e Ax em evidência para ser internalizado; **F:** Visão geral de *T. muris* em forma de pseudocisto, flagelos internalizados, sem presença de parede cística. MEV.

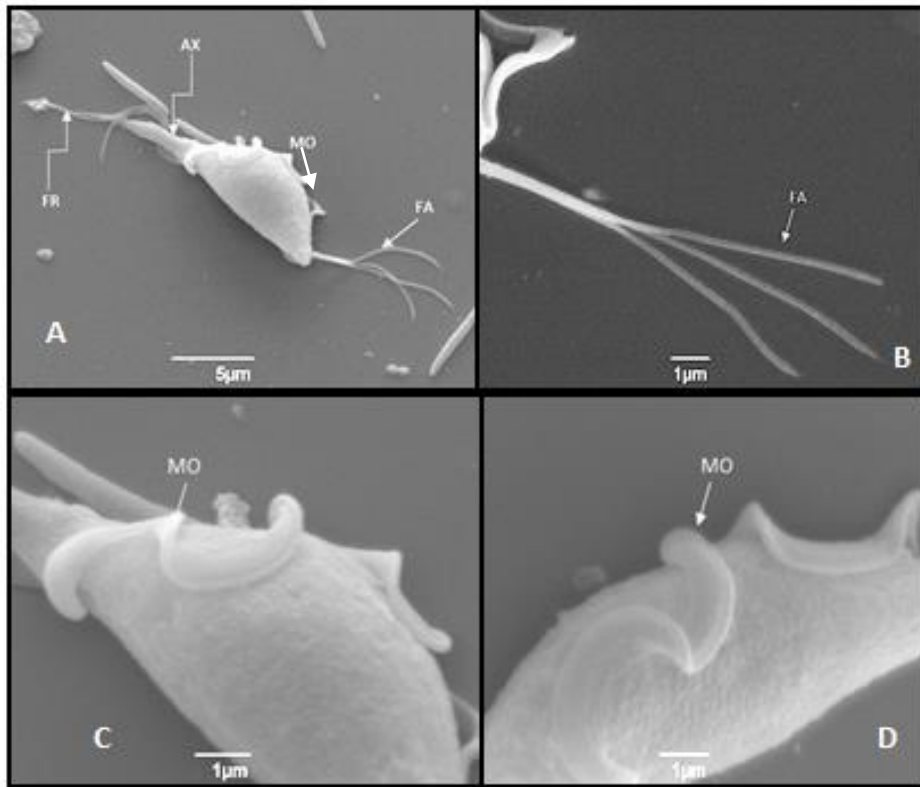


Figura 21: Visão estrutural panorâmica de *Tritrichomonas muris* em amostras da mucosa intestinal de hamster golden. **A:** Estrutura do axóstilo (Ax), três flagelos anteriores (Fa), membrana ondulante (Mo) na ponta da seta, flagelo recorrente (Fr); **B:** Três dos flagelos anteriores (F) (ponta da seta) de *T. muris*; **C e D:** Trofozoíto de *T. muris*, em destaque a estrutura da Mo com 3 a 4 ondulações. MEV.

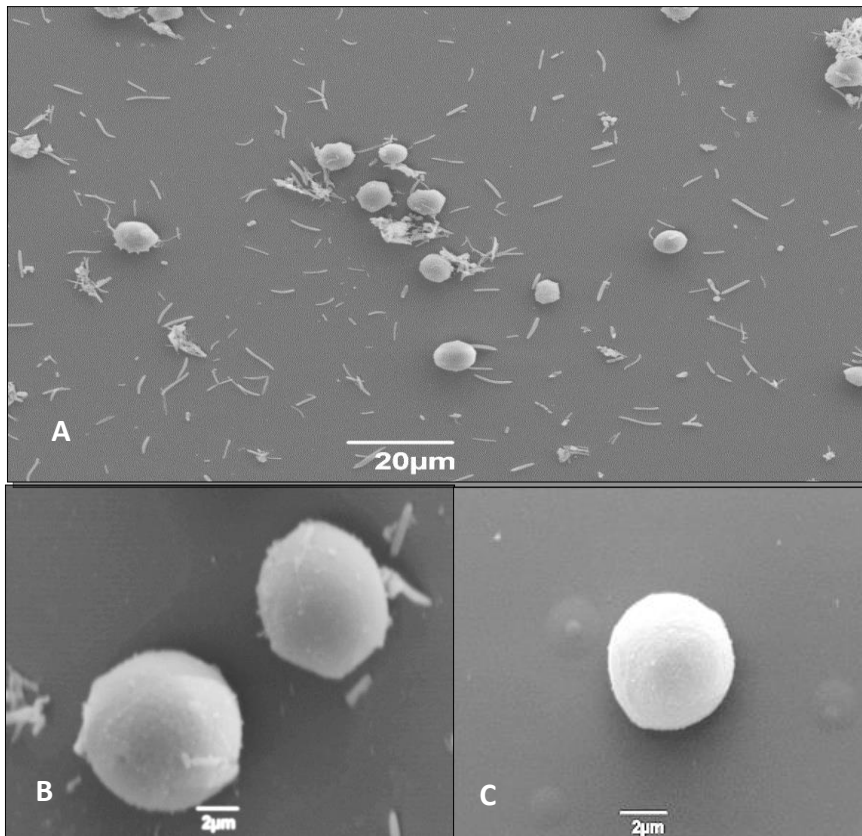


Figura 22: A, B e C: Visão geral de *Tritrichomonas muris* em forma de pseudocistos observados por vários aumentos. Flagelos internalizados e ausência de parede cística. MEV.

6.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Tritrichomonas muris*

Na MET foi possível visualizar detalhes de estruturas que não poderiam ser vistas na microscopia óptica e nem em MEV. Os trofozoítos apresentaram formato piriforme com inúmeros hidrogenossomos em seus interiores. Os hidrogenossomos apresentaram formato arredondado e membrana dupla, de tamanho variado e conteúdo granuloso, sendo que a maioria estava associada ao axóstilo. Não foram visualizadas vesículas periféricas.

O axóstilo foi observado como uma fita delimitada por dois filamentos, um dorsal e outro ventral com interior contendo diversos grânulos, entre eles grânulos de glicogênio, que são pontos em forma de roseta mais escuros e afunilando na porção final. No decorrer da evolução de *T. muris*, estes apresentam polaridade e

flagelos externalizados. Percebe-se que os protozoários adquiriram formas arredondadas (ou amebóides) e internalizaram todos os seus flagelos, transformando-se em um pseudocisto.

Foi constatado que todas as estruturas e organelas presentes nos parasitos piriformes são mantidas nos pseudocistos; porém, com algumas diferenças, dentre elas os flagelos, que ficam localizados dentro de sulcos citoplasmáticos circundados por uma membrana.

As figuras 23 e 24 assinalam as ultraestruturas de *T. muris* observados em MET.

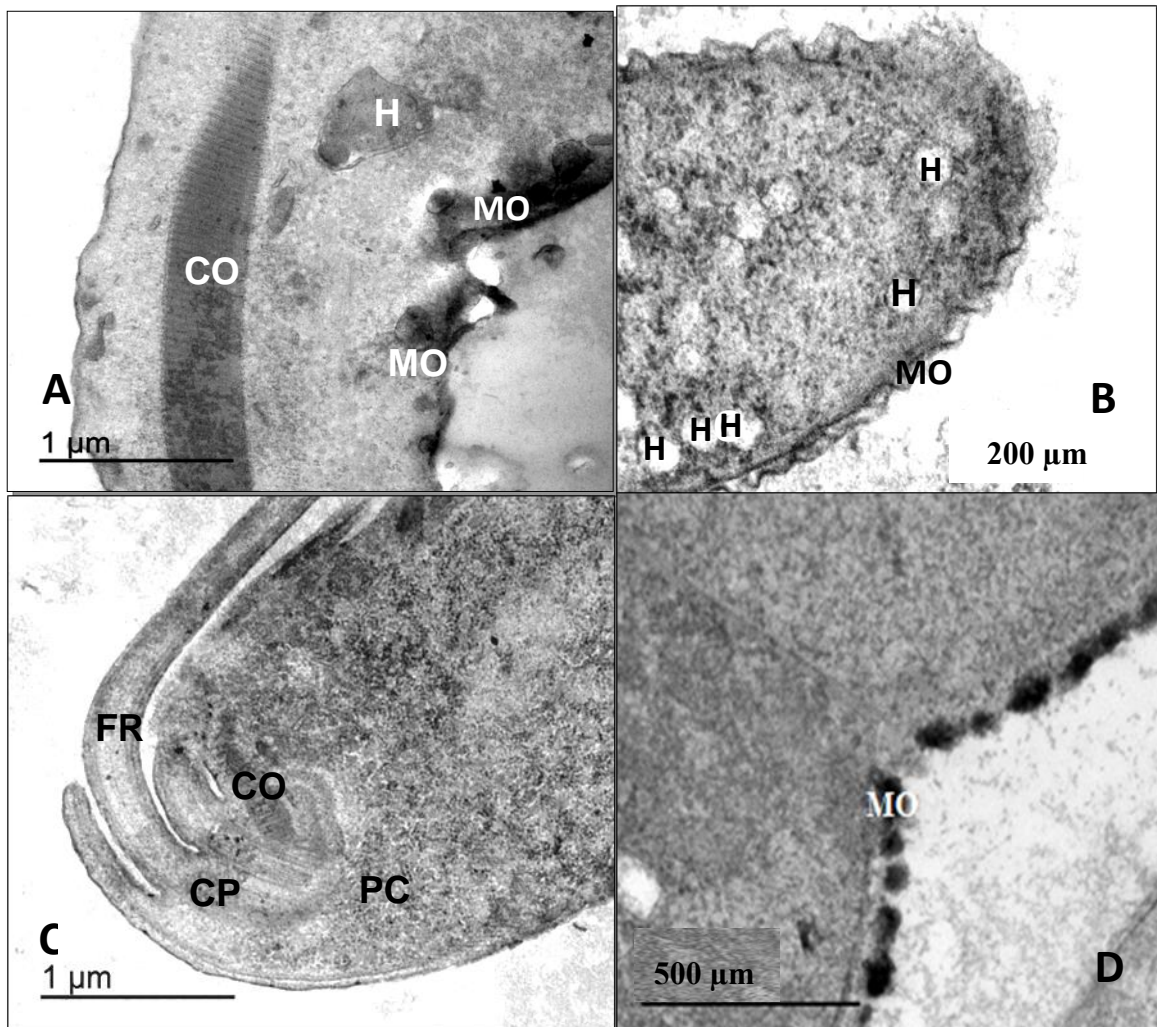


Figura 23: Ultraestrutura do trofozoíto de *Tritrichomonas muris*. **A:** Costa (Co) evidente no centro, com bandas claras e escuras em corte longitudinal e membrana ondulante (Mo) e hidrogenossomos (H); **B:** Trofozoíto de *T. muris*, destacando-se os hidrogenossomos (H), membrana ondulante (Mo) em evidência em um corte longitudinal; **C:** Trofozoíto de *T. muris*, destacando-se o flagelo recorrente

(Fr) que tem seu início na região do corpo parabasal (Cp), apresentando a costa (Co) e o canal periflagelar (Pc) em um corte transversal; **D**: Trofozoíto em corte longitudinal, Mo transversal. MET.

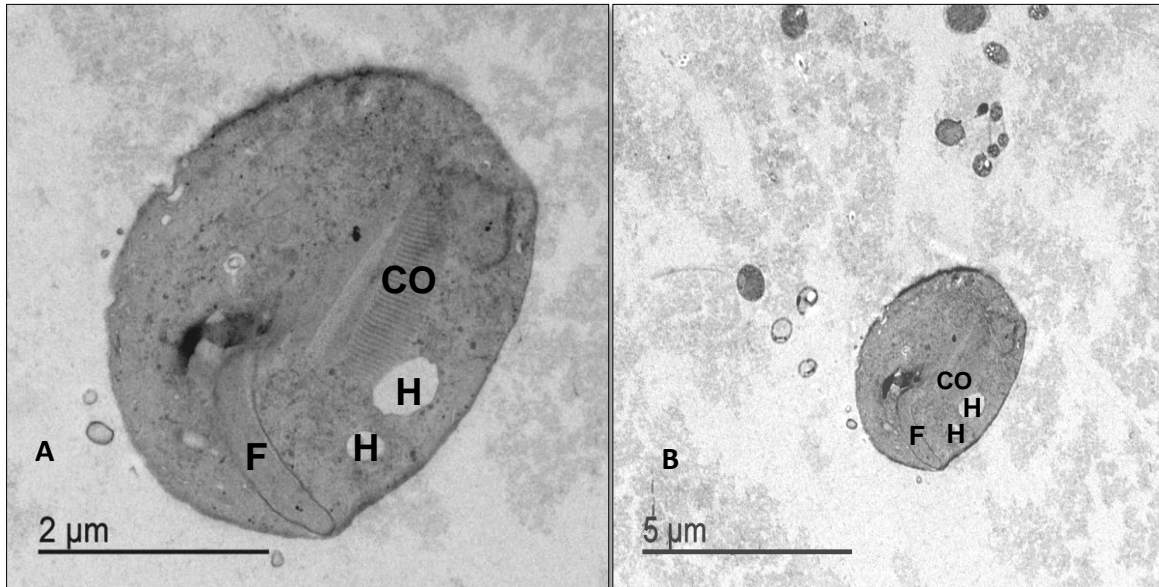


Figura 24: Pseudocistos de *Tritrichomonas muris*. **A:** Costa (CO) evidente no centro, com bandas e escuras em corte longitudinal e hidrogenossomos (H); **B:** Pseudocistos, destacando-se os hidrogenossomos (H), evidência em um corte longitudinal, destacando-se o flagelo (F) que tem seu início na região do corpo parabasal. MET.

6.7. Levantamento parasitológico retrospectivo de 2005 a 2018

A figura 25 mostra a prevalência dos agentes parasitários presentes na colônia de hamsters golden estudada durante os 13 anos de análise. No ano de 2005, foram detectados quatro parasitos: *Syphacia obvelata*, *Spironucleus muris*, *Giardia muris* e *Tritrichomonas muris*, sendo que *T. muris* foi detectado ao longo de todos os anos de estudo.

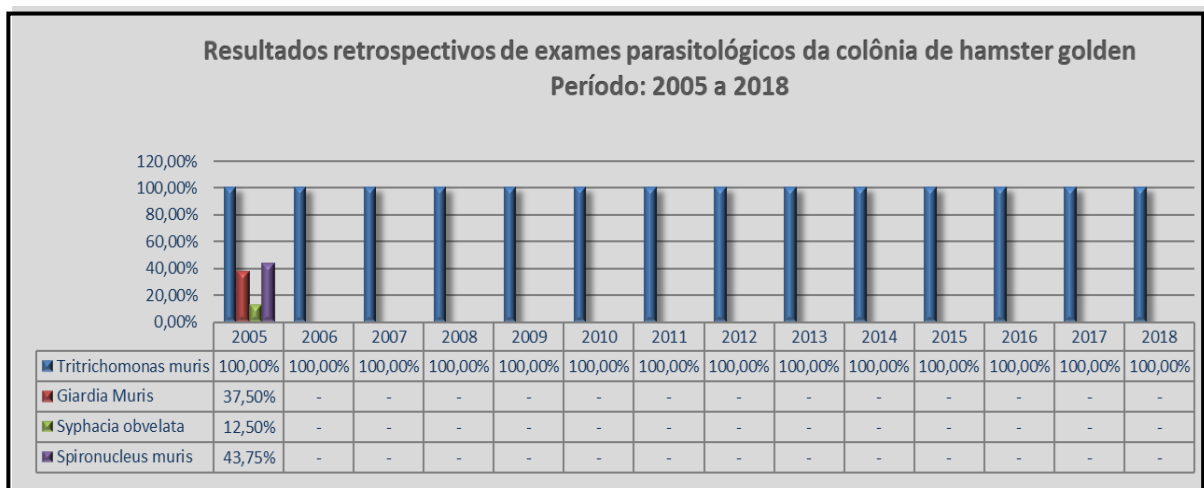


Figura 25: Prevalência dos parasitos identificados na criação de hamsters golden (*Mesocricetus auratus*) entre 2005 e 2018.

7. DISCUSSÃO

Gilioli et al. (2000) analisaram condições parasitárias de 18 instalações brasileiras de roedores, incluindo a presença de parasitos, bem como a existência de barreiras contra infecções e programa de fiscalização sanitária das colônias. Os dados mostraram que a maioria dos biotérios analisados não possuía barreiras sanitárias eficientes, além de apresentar uma grande variedade de infecções por ecto e endoparasitos. Da mesma forma, Bicalho et al. (2007) não evidenciaram barreiras de proteção apropriadas nos 13 biotérios avaliados no estado de Minas Gerais, com um elevado número de agentes parasitários identificados.

Neste estudo, no período compreendido entre 2005 e 2018, foram encontrados os parasitos *Syphacia obvelata* (12,50%), *Spironucleus muris* (43,75%), *Giardia muris* (37,50%) e *Tritrichomonas muris* (100%), sendo *T. muris* o agente etiológico mais prevalente na criação de hamster analisada, detectado em todos os anos estudados. Salienta-se, contudo, que os animais analisados nesta pesquisa podem ter sido infectados antes da sua chegada às instalações do ICTB-Fiocruz. Esta elevada prevalência de *T. muris* no plantel de hamster golden endossa ainda mais a necessidade de aprofundar os estudos sobre a sua patogenicidade, bem como avaliar seu potencial risco para a criação de roedores de laboratório e seus malefícios quando presentes nas pesquisas.

Já Gilioli (2003) considerou *T. muris* um agente comensal, que não está relacionado a interferências nos resultados experimentais quando roedores de laboratório são infectados. Kashiwagi et al. (2009) afirmaram que determinadas proteínas expressas no trato intestinal desempenham funções distintas não relacionadas à patogenicidade promovida pela infecção em si, mas pela alteração acarretada no interior da mucosa intestinal dos roedores afetados, o que pode sugerir que o agente não seja considerado patogênico. Em contrapartida, existem relatos que contestam as interações hospedeiro-protozoário de espécies consideradas não patogênicas, uma vez que, em muitas situações, podem comprometer o estado de homeostase a longo prazo do compartimento das células T nas mucosas intestinais dos animais parasitados (ESCALANTE, 2017). A necessidade de exames ocasionais nos hamsters deste trabalho, ou seja, fora do período contemplado pelo programa de monitoramento sanitário devido a alguns sinais clínicos (ex: diarreia, prostração, pelos eriçados, etc.), aliado à elevada

prevalência do protozoário em questão, consistem em fortes indicativos de que *T. muris* seja um agente patogênico. Zarei et al. (2018) relataram que roedores infectados por *T. muris* apresentaram diarreia e anorexia.

Desta forma, tendo em vista que *T. muris* apresenta todas as estruturas de um agente patogênico, torna-se importante compreender melhor o processo do seu ciclo de vida, a fim de responder algumas incógnitas ligadas, fundamentalmente, ao seu ciclo reprodutivo, forma infectante e modo de transmissão. Neste intuito, o cultivo *in vitro* realizado neste estudo, permitiu observar como o parasito sobrevive fora da mucosa intestinal, considerando, inclusive, a escassez de fluidos e as consequências advindas dessas perdas.

O cultivo *in vitro* de *T. muris* é uma técnica que mimetiza as condições intestinais, onde o protozoário encontra aptidão fisiológica favorável para o seu desenvolvimento, sendo capaz de expressar suas fases distintas dentro do seu ciclo de vida (SAEKI et al. 1983). Pôde-se observar claramente que nos cultivos realizados neste trabalho, à medida que os trofozoítos perdiam sua mobilidade em decorrência da internalização dos seus flagelos, nos diferentes meios sintéticos, era porque havia perda de nutrientes necessários, tornando-se, assim, um ambiente impróprio para a sua sobrevivência, o que fez com que adquirissem sua forma de resistência (pseudocistos).

De acordo com Koyama et al, (1987), a forma de transmissão de *T. muris* ocorre por coprofagia quando o hospedeiro ingere as fezes contendo os pseudocistos. Ao passar pelo tubo digestivo, os pseudocistos sofrem a ação dos fluidos intestinais e se transformam em trofozoítos, que representam a forma intermediária do ciclo do parasito (KOYAMA et al, 1987; SANTOS et al. 2018a). Santos et al. (2018b) afirmaram que ao chegarem no ceco, seu habitat natural, os trofozoítos se multiplicaram por divisão binária e ao se deslocarem para o cólon, o conteúdo solidificado pelas fezes já formadas, promoveu uma alteração na forma do protozoário em função dessa desidratação, transformando-se em pseudocisto. Assim, o protozoário é excretado sob a forma de pseudocisto. De fato, este relato corrobora com o que foi observado neste trabalho, que ao realizar o cultivo diretamente do conteúdo da mucosa intestinal, houve uma perda de fluidos naturais, fato que agilizou esta transformação do protozoário.

Este processo de transformação morfológica também esclarece os resultados obtidos pelos métodos coproparasitológicos. Quando realizados diretamente da

mucosa intestinal, houve detecção de trofozoítos, uma vez que da mesma forma, o ambiente era adequado para o seu crescimento. Por outro lado, ao realizar os exames parasitológicos a partir das fezes formadas foram detectados pseudocistos, seguindo o ciclo natural do parasito.

Cabe salientar sobre os meios de cultivo sintéticos utilizados para melhor adaptação desses protozoários, visto que é essencial encontrar condições ambientais semelhantes ao habitat do hospedeiro, em termos de nutrientes no trato intestinal, condições de anaerobiose ou microaerofilia e, até mesmo, da microbiota disponível. Além disso, é importante considerar as diferentes características bioquímicas intraespecíficas quando se trata de parabasalídeos (MÜLLER, 1990).

Neste sentido, o perfil de crescimento dos protozoários nos quatro meios analisados foram semelhantes até o momento do declínio; porém o meio Diamond's obteve o melhor desempenho em manter células vivas, sugere-se que a maltose inserida na composição do meio seja um importante nutriente para a sobrevivência do parasito em questão. Isto se deve às altas atividades de enzimas no conteúdo do estômago e ceco dos hamsters, tais como: carboximetilcelulase, xilanase, pectinase, amilase e dissacaridasas (maltase, invertase) (MAROUNEK et al., 2016). Tal assertiva pode ser afirmada, pois a maltose representa uma forma mais simples de açúcar que entra mais facilmente no ciclo de Krebs, uma vez que as mitocôndrias de protozoários são rudimentares (hidrogenossomos).

Nos estudos sobre parabasalídeos em amostras fecais de caprinos, ovinos e suínos, Carreiro (2018) não visualizou o protozoário em forma de trofozoíto em 24 horas após a coleta do material, nem por exame direto tampouco pelo método de flutuação, sendo possível identificar apenas pseudocistos. A visualização do trofozoíto apenas foi detectada após 48 horas de repouso, em temperatura ambiente (25 a 28 °C), quando o protozoário retornou à sua forma vegetativa e começou a se locomover. Por outro lado, constatou-se que o material fecal dos hamsters golden deste estudo precisou ser processado logo após a coleta para não passar à forma de trofozoíto para pseudocisto. Quando coletadas as amostras da mucosa intestinal contendo trofozoítos, as mesmas eram encaminhadas em solução salina (PBS) para o procedimento de cultivo *in vitro* e caso não fossem inoculadas nos meios imediatamente, os protozoários se tornavam inviáveis. Isto se deve ao curto tempo de sobrevivência de *T. muris* de, no máximo, 6 horas, detectado pela curva de crescimento.

No tocante aos exames coproparasitológicos, o método direto parece ser mais indicado, principalmente para a pesquisa de cistos de protozoários a partir de fezes formadas e de trofozoítos de protozoários em fezes diarreicas recém-emitidas.

É sabido que o *T. muris* possui hidrogenossoma, organela que desempenha funções semelhantes às das mitocôndrias (BENCHIMOL, 2009). Provavelmente devido ao fato de tal organela não metabolizar a glicose (MÜLLER et al., 2012), o protozoário examinado não foi identificado adequadamente no meio saturado do método Willis-Mollay.

No que se refere aos aspectos morfológicos de *T. muris*, pouco se sabe a respeito das técnicas de fixação e coloração. Entretanto, existe um conjunto de técnicas de coloração que permite fazer uma correta caracterização de *T. foetus*. É notório que a coloração de Giemsa consiste no método de eleição deste flagelado (FOLHADELLA et al. 2002). Embora a técnica em questão seja útil para a coloração de ambas as espécies parasitárias (*T. foetus* e *T. muris*) (LUN; GAJADHAR, 1999; SANTOS et al., 2017a), o presente estudo averiguou que o método de coloração pelo Panótico rápido possibilitou visualizar mais eficazmente todas as estruturas do protozoário. Ademais, é válido considerar que a técnica do Panótico é mais acessível e rápida quando comparado como o Giemsa, além de ser menos onerosa.

No que concerne às análises ultraestruturais processadas tanto por MET quanto por MEV, constatou-se que *T. muris* se assemelha bastante às características de *T. foetus* (ORTEGA-MORA; ROJO-VASQUEZ, 1996). Todos os segmentos detectados no protozoário aqui estudado são equivalentes aos já descritos na literatura (WENRICH, 1921), sendo possível caracterizar a sua morfologia com exatidão, visualizando os hidrogenossomos de *T. muris* distribuídos por todo o citoplasma, sendo este concentrado notadamente na região onde o axóstilo e a costa estão localizados. No entanto, as vesículas periféricas que são observadas em forma de um compartimento localizado na periferia dos hidrogenossomos (MATTERNA; HONIGBERG, 1971; LINDMARK.; MÜLLER, 1973); não foram visualizadas nas análises deste estudo.

Por fim, mediante todas as ponderações discutidas nesta dissertação, os resultados inéditos encontrados nos estudos de *T. muris* em hamster golden é de grande importância para a ciência em animais de laboratório em prol da comunidade científica mundial, permitindo, assim, que futuros estudos aprimore ainda mais o conhecimento do referido agente.

8. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- O método coproparasitológico mais adequado para a identificação de *T. muris* é o exame direto, que demonstrou 100% de acurácia em seus resultados;
- Willis-Mollay não é uma técnica parasitológica apropriada para identificar *T. muris*, pois o agente não se desenvolve satisfatoriamente na solução saturada de glicose utilizada neste tipo de exame.
- Para o cultivo *in vitro* de *T. muris*, o meio Diamond's é o meio de eleição (padrão-ouro), por demonstrar maior adaptação e crescimento do agente.
- Em função do curto tempo de sobrevivência de *T. muris* em hamsters (\cong 6 horas), é necessário processar as amostras fecais desses animais imediatamente após a sua coleta, com o intuito de não inviabilizar a sua correta identificação de fases dentro do seu ciclo de vida (trofozoítos x pseudocistos).
- Panótico rápido e Giemsa são técnicas de coloração adequadas para realizar caracterização morfológica de *T. muris* em hamster golden, ambas permitindo uma boa visualização das suas estruturas.

9. PERSPECTIVAS

Novas pesquisas precisam ser implementadas, na tentativa de se elaborar meios sintéticos que permitam prolongar o tempo de cultivo de *T. muris*.

Pretende-se também aprimorar técnicas moleculares para melhor entendimento do agente estudado.

10. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. 387p.
- APPEL, L.; MICKELSEN, W. D.; THOMAS, M. H.; HARMON, W. M. A comparison of techniques used for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infections in beef bulls. *Agri-practice*, v.14, p. 30-34, 1993.
- BAKER, D. G. **Flynn's parasites of laboratory animals**. 2. ed. Boston: Wiley-Blackwell: 2007.
- BENCHIMOL, M. Hydrogenosomes under microscopy. **Tissue and Cell**, v. 41, n. 3, p. 151-168, 2009.
- BICALHO, K. A. **Condições higiênico-sanitárias, ocorrência de parvovírus e de parasitos de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros**. 2012. 161f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2012.
- BICALHO, K. A.; ARAÚJO, F. T. M.; ROCHA, R. S.; CARVALHO, O. D. S.. 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**, v. 59, n. 6, p. 1478-1484, 2007.
- BORJI, H.; KHOSHNEGAH, J.; RAZMI, G.; AMINI, H.; SHARIATZADEH, M. A survey on intestinal parasites of golden hamster (*Mesocricetus auratus*) in the northeast of Iran. **Journal of parasitic diseases**, India, v. 38, n. 3, p. 265-268, 2014.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Boston: Jones & Bartlett Learning, 1999.
- CARREIRO, C. C. Identificação de Parabasalídeos em amostras fecais de pequenos ruminantes e suínos, 2018. 109p. Tese (Doutorado em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Veterinária Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2018.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiological reviews**, EUA, v. 57, n. 4, p. 953-994, 1993.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed., CBRA, Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- CHINCHILLA, M., PORTILLA, E., GUERRERO, O. M.; MARÍN, R. Presencia de quistes en *Tritrichomonas muris*. **Revista de biología tropical**, Costa Rica, v. 35, n. 1, p. 21-24, 1987.

COL, E. B. **Parasitos de camundongos de laboratório: uma abordagem informatizada com animações gráficas**. 2003. 89p. Dissertação (Ciências Biológicas-Parasitologia)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

DANIEL, W. A.; MATTERN, C. F.; HONIGBERG, B. M. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas muris* (Grassi). **The Journal of protozoology**, EUA, v. 18, n. 4, p. 575-586, 1971.

DE CARLI, G. A. **Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas, métodos e técnicas**. Rio de Janeiro: Medsi, 2011.

DENNIS, W. R.; STONE, W. M.; SWANSON, L. E. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 124, n. 9, p. 47-50, 1954.

DIAMOND, L. S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **Journal of Parasitology**, v. 43, p. 488-490, 1957.

ESCALANTE, N. K. **Regulation of Mucosal T cell Activation and Inflammation by NLRC3 and *Tritrichomonas muris***. 2017. 134p. Tese (Doutorado em Immunology)-University of Toronto, 2017.

FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Laboratory Animals**, v. 48, n. 3, p. 178-192, 2014.

FOLHADELLA, I.M.; FONSECA A.H.; JESUS V. L. T.; PEREIRA M. J. S. Desempenho de técnicas de coloração e fixação para o *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) (Protozoa: Trichomonadida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal - SP, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2002.

FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISSON, M. T.; NEWCOMER, C. E.; QUIMBY, F. W.; SMITH, A. L. **The Mouse in Biomedical Research: normative biology, husbandry, and models**. 2. ed. Elsevier, 2007. (Volume 2).

FLYNN, R.J. **Parasites of laboratory animals**. Iowa State University Press, Ames. 1 ed. USA. p. 10-11, 1973

GALLETI, S. R. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 33-35, 2003.

GERMOT, A.; PHILIPPE, H.; AND LE GUYADER, H. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, local, v. 93, p.14614-14617, 1996.

GILIOLI, R. **Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos**.

Campinas, 2003. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)-Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 2003.

GILIOLI, R.; ANDRADE, L. A. G.; PASSOS, L. A. C.; SILVA, F. A.; RODRIGUES, D. M.; GUARALDO, A. M. A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 33-37, 2000.

GOOKIN, J. L.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEVY, M. G.; GAGER, R. B.; BENRUD, J. G. J. Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*. **Schaumburg, Local**, v. 215, n. 10, p. 1450-1454, nov. 1999.

GRANGER, B. L.; WARWOOD, S. J.; BENCHIMOL, M.; SOUZA, W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 86, p. 699-709, 2000.

GRASSÉ, P. P. Contribution B l'étude de flagelles parasites. **Archives de zoologie expérimentale et générale**, Paris, v. 65, p. 345-602, 1926.

HERNÁNDEZ, A.; MOLINA, M.; MORALES, G.; GARMENDIA, J.; NAVA, Z. Efecto como desparasitante del metronidazol y tinidazol frente a *Tritrichomonas muris* en hamsters. **Zootecnia Tropical**, v. 26, n. 1, p. 71-77, 2008.

JERGENS, A. E.; WILLARD, M. D. Doenças do intestino grosso. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, Edward C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1305-1325.

KASHIWAGI, A.; KUROSAKI, H.; LUO, H.; YAMAMOTO, H.; OSHIMURA, M.; SHIBAHARA, T. Effects of *Tritrichomonas muris* on the mouse intestine: a proteomic analysis. **Experimental animals**, v. 58, n. 5, p. 537-542, 2009.

KOYAMA, T.; ENDO, T., ASAHI.; H., KUROKI.; T. Life cycle of *Tritrichomonas muris*. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, v. 264, n. 3-4, p. 478-486, 1987.

LEMO, P. A. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Aspects of *Trichomonas vaginalis*' infection and diagnostic methods Aspectos relacionados com a infecção por *Trichomonas vaginalis* e diagnóstico laboratorial. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**, Coimbra, v. 8, n. 2, p. 152-162, 2014.

LEVY, M. G.; GOOKIN, J. L.; POORE, M.; BIRKENHEUER, A. J.; DYKSTRA, M. J.; LITAKER, R. W. *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 99-104, fev. 2003.

LINDMARK, D. G.; MÜLLER, M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, Oklahoma, v. 248, p. 7724-7728, 1973.

LINDSAY, D. S.; SUNDERMANN, C. A.; BAKER, D. G. Biology of the Protozoa. In: BAKER, D. G. **Flynn's Parasites of Laboratory Animals**. 2. ed. Wiley-Blackwell: 2007. p.15-25.

LONGHI, D. A. Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas, 2012. 116p. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de PósGraduação em Engenharia de Alimentos. Santa Catarina, 2012.

LUN, Z. R.; GAJADHAR, A. A. A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 471-474, 1999.

MAROUNEK, M.; MRÁZEK, J.; VOLEK, Z.; SKŘIVANOVÁ, E.; KILLER, J. Pregastric and caecal fermentation pattern in Syrian hamsters. **Mammalia**, v. 80, n. 1, p. 83–89, 2016.

MARQUES, M. A. P. Controle Parasitológico. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Org.) **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. p. 303-315.

MARQUES, T.; CRUZ, R. J. Controle Parasitológico. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. 1. ed. São Paulo: Atheneu. 2009. p. 337-357.

MATTERN, C.; DANIEL, W.A. *Tritrichomonas muris* in the hamster: pseudocysts and the infection of newborn. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 435-439, 1980.

MATTERNA. C. F. D.; HONIGBERG, B. M. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas muris* (Grassi). **The Journal of protozoology**, v. 18, n. 4, p. 575-586, 1971.

MILKEN, V. M. F.; BASTOS, J. E. D.; MIRANDA, R. L.; BARBOSA, T. S.; ZAVANELLA, C. M.; CABRAL, D. D. Presença de *Trichomonas* em urinálise de cães e gato. **Bioscience Journal**, local, v. 24, n. 2, 2008.

MOLINARO, E. M., CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2009. 210p. (volume 1).

MOLINARO, E. M.; MAJEROWIC. J.; COUTO.S. E.; BORGES C. C. A.; MOREIRA C. W.; RAMOS S. Animais de laboratório. In: **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de janeiro: EPSJV, 2009. p. 203. (volume 1).

MORI, C. M. C.; CHELINI, M. O. M.; COUTO, R. E. S. Hamster. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017. p. 252-253.

MÜLLER, M. Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. In: HONIGBERG, B. M. **Trichomonads parasitics in humans**. Berlin Heidelberg New York: Springer, 1990. p. 53-83.

MÜLLER, M.; MENDEL, M.; VAN HELLEMOND, J. J.; HENZE, K.; WOEHLER, C.; Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, EUA v. 76, n. 2, p. 444-495, 2012.

NEVES, D. P. **Parasitologia humano**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

NILSSON, M. R.; CORRÊA, W. M. Isolamento do vírus do aborto equino no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológicos**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 23-25, 1966.

NOVAES, M. T.; VILHENA, I. F. Avaliação de diferentes técnicas parasitológicas no diagnóstico de helmintoses caninas. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 71-76, 2015. Suplemento.

ORTEGA-MORA, L. M.; ROJO-VASQUEZ, F. A. Trichomoniasis genital bovina (I). **Medicina Veterinaria**, Recife, v. 13, p. 7-13, 1996.

PEREIRA-NEVES, A.; RIBEIRO, K. C.; BENCHIMOL, M. Pseudocysts in Trichomonads: new insights. **Protist**, v. 154, p. 313-329, 2003.

PARKINSON, M.; O'BRIEN, T. M. A.; MEREDITH, A.; SIMON, C. B.; CLIFFORD, K.R.P.C. Diagnosis of ecto-and endoparasites in laboratory rats and mice. **Journal of visualized experiments**, v. 55, e2767, p. 1-4, 2011.

REIS, S. R.; FRANCO, A. M. R. **Manual básico de bioterismo**. Elaboração Projeto Fronteiras: Alto Rio Negro; apoio FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos. Manaus, 2012. 47 p.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos tópicos ocidentais. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2015.

RIBEIRO, A. R. S.; CRUZ, R. J.; MARQUES, T. Diagnóstico Parasitológico. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIÁ, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 2017. p. 394-398.

RIEDMÜLLER, L. Über die morphologie, übertragungsversuche, und klinischebedeutung der beimsporadischen abortus des rindesvorkommenden Trichomonaden. **Zentralblatt Für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung 1-Originale Medizinisch Hygiensche Bakteriologie Virusforschung und Parasitologie**, v. 108, p. 103-118, 1928.

SAEKI, H.; TOGO, M.; IMAI, S.; ISHII, T. A new method for the serial cultivation of *Trichomonas muris*. **Nihon Juigaku Zasshi**, Japão, v. 45, n. 2, p. 151-156, 1983.

SANTOS, C. S. **Parabasalídeos de animais domésticos: morfologia, diagnóstico e algumas considerações epidemiológicas.** 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

SANTOS, I. S. R.; SILVA, C. S.; SILVA, C. H.; CARVALHO, L. G.; CAMPOS, C. F. Estudo da prevalência de *Tritrichomonas muris* em Hamster Golden em biotério de criação. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 4 n. 1, p. 73, 2016.

SANTOS, I. S.; CARREIRO, C. C. ; JESUS, V. L. T. ; BARREIRA, J. D. ; ROSSI, M. I. D. Aspecto Morfotintorial de *Tritrichomonas muris* em Colônia Hamster golden (*Mesocricetus auratus*). **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 73, 2017a.

SANTOS, I. S.; CARREIRO, C. C.; JESUS, V. L. T. ; BARREIRA, J. D.; ROSSI I. D. Cultivo de *Tritrichomonas muris* em Meios Sintéticos para Análise Morfotintorial: estudos preliminares. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 150, 2017b.

SANTOS, I. S.; CARREIRO, C. C.; JESUS, V. L.T.; ANDRADE, M. C. R. Diagnóstico de *Tritrichomonas muris* em hamster de companhia no município do Rio de Janeiro - **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, p. 33, 2018a.

SANTOS, I. S.; JESUS, V. L. T.; CARREIRO, C. C.; ANDRADE, M. C. R. Diagnóstico de *Tritrichomonas muris* em hamster (*Mesocricetus auratus*) no município do Rio de Janeiro, RJ. **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 5-109, 2018b.

SISTEMA INFORMATIZADO DE CONTROLE DE PRODUÇÃO ANIMAL (SICOPA). Disponível em: <<http://www.sicopa.cecal.fiocruz.br/>>. Acesso em: 26 dez. 2018.

SILVA FILHO, F. C.; SOUZA, W. The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells in vitro. **Cell Structure and Function**, Londres, v. 13, p. 301-310, 1988.

SUCKOW, M. A.; STEVENS, K. A.; WILSON, R. P. **The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents.** Nova York: Academic Press, 2012.

VILELA, R. C. **Interação de *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus* com diferentes tipos celulares.** 2010. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Biofísica Universidade Federal do Rio de Janeiro, IB, CCS, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, 2010.

WAGGIE, K.; KAGIYAMA, N.; ALLEN, A. M.; NOMURA, T. **Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals.** US, Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, National Center for Research Resources, Bethesda, 1994 (NIH publication Nº 94-2498) 226.

WENRICH, D.H. The structure and division of *Trichomonas muris* (Hartmann). **Journal of Morphology**, EUA, v. **36**, p. 119, 1921.

ZAREI, Z.; MOHEBALI, M.; KHANALIHA, K., KIA, E. B., HAGHI, A. M., HEIDARI, Z.; REZAEIAN, M. Detection of Pseudocyst Forms of *Trichomonas muris* in Rodents from Iran. **Iranian Journal of Public Health**, Irã, v. 47, n. 5, p. 729, 2018.

11. ANEXOS

Anexo 1

Recomendações da FELASA quanto à frequência de monitoramento sanitário de parasitos a serem examinados em hamsters (*Mesocricetus auratus*)

ENDOPARASITO	TRIMESTRAL
<i>Aspicularis tetraptera</i>	X
<i>Entamoeba muris</i>	X
<i>Giardia muris</i>	X
<i>Hymenolepis diminuta</i>	X
<i>Rodentolepis nana</i>	X
<i>Spironuleus muris</i>	X
<i>Syphacia muris</i>	X
<i>Syphacia obvelata</i>	X
<i>Tritrichomonas muris</i>	X

Fonte: FELASA (2014)

Anexo 2

Publicações relacionadas à dissertação

1. **SANTOS, I.S.;** SILVA, C.S.; SILVA, C.H.; CARVALHO, L.G.; CAMPOS, C.F. Estudo da prevalência de *Tritrichomonas muris* em hamster golden em biotério de criação. **REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (RESBCAL)**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 73, 2016.
2. **SANTOS, I.S.;** CARREIRO, C.C.; JESUS, V.L.T.; BARREIRA, J.D.; ROSSI, M.I.D. Aspecto morfotintorial de *Tritrichomonas muris* em colônia de hamster golden (*Mesocricetus auratus*). In: II Seminário de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Rio de Janeiro. **RESBCAL**, v. 5, p. 149, 2017.
3. **SANTOS, I.S.;** CARREIRO, C.C.; JESUS, V.L.T.; BARREIRA, J.D.; ROSSI, M.I.D. Estudo retrospectivo ds enteroparasitoses diagnosticadas em hamster golden (*Mesocricetus auratus*) em uma instalação de criação no Rio de Janeiro. In: II Seminário de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Rio de Janeiro. **RESBCAL**, v. 5, p. 55-56, 2017.
4. **SANTOS, I.S.;** CARREIRO, C.C.; JESUS, V.L.T.; BARREIRA, J.D.; ROSSI, M.I.D. Cultivo de *Tritrichomonas muris* em meios sintéticos para análise morfotintorial - estudos preliminares. II Seminário de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Rio de Janeiro. **RESBCAL**, v. 5, p. 150, 2017.
5. **SANTOS, I.S.;** CARREIRO, C.C.; JESUS, V.L.T.; ANDRADE, M.C.R. Diagnóstico de pseudocistos de *Tritrichomonas muris* em fezes formadas de hamster golden (*Mesocricetus auratus*) por três métodos parasitológicos. In: III Seminário de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Rio de Janeiro. **RESBCAL**, v. 6, p. n. 2, p. 161, 2018.
6. **SANTOS, I.S.;** CARREIRO, C.C.; JESUS, V.L.T.; ANDRADE, M.C.R. Curva de crescimento de *Tritrichomonas muris* em meios sintéticos. In: III Seminário de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Rio de Janeiro. **RESBCAL**, v. 6, n. 2. p. 160, 2018.
7. **SANTOS, I.S.;** CARREIRO, C.C.; JESUS, V.L.T.; ANDRADE, M.C.R. Análise morfotintorial de pseudocistos e trofozoítos de *Tritrichomonas muris* a partir de amostras fecais de hamster golden (*Mesocricetus auratus*). In: III Seminário de Ciências e Tecnologia em Biomodelos, Rio de Janeiro. **RESBCAL**, v. 6, n. 2., p. 160, 2018.
8. **SANTOS, I.S.;** CARREIRO, C. C. ; JESUS, V. L. T.; ANDRADE, M.C.R. Diagnóstico de *Tritrichomonas muris* em hamster (*Mesocricetus auratus*) no município do Rio de Janeiro, RJ. ANCLIVEPA, Rio de Janeiro. REVISTA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA DO CLÍNICO VETERINÁRIO DE PEQUENOS ANIMAIS, v. XXIII, p. 21-24, 2018.
9. **SANTOS, I.S.;** CARREIRO, C.C.; JESUS, V.L.T.; ANDRADE, M.C.R. Diagnóstico de *Tritrichomonas muris* em hamsters de companhia no município do Rio de Janeiro, RJ. ANCLIVEPA, Rio de Janeiro. REVISTA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA DO CLÍNICO VETERINÁRIO DE PEQUENOS ANIMAIS, v. XXIII, p. 32, 2018.

Anexo 3

Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais, n. LW-27/17 (CEUA-Fiocruz)



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Vice-presidência de Pesquisa e
 Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
 no Uso de Animais

LICENÇA

LW-27/17

Certificamos que o protocolo (P-7/17-3), intitulado "Controle de Qualidade dos Animais Criados, Mantidos e Fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fiocruz e outros serviços prestados nesta área.", sob a responsabilidade de MARCIA SORAYA CARRETEIRO DE OLIVEIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 25/09/2021 e inclui o uso total de :

Rattus norvegicus

- 127 Machos de Wistar, Idade: 8 Semana(s), Peso: 300,0000 Grama(s).
- 128 Fêmeas de Wistar, Idade: 8 Semana(s), Peso: 300,0000 Grama(s).

Oryctolagus cuniculus

- 70 Machos de Nova Zelândia, Idade: 12 Semana(s), Peso: 3,0000 Kilo(s).
- 70 Fêmeas de Nova Zelândia, Idade: 12 Semana(s), Peso: 3,0000 Kilo(s).

Cavia porcellus

- 105 Machos de Short Hair, Idade: 10 Semana(s), Peso: 400,0000 Grama(s).
- 105 Fêmeas de Short Hair, Idade: 10 Semana(s), Peso: 400,0000 Grama(s).

Mesocricetus auratus

- 75 Machos de Golden, Idade: 10 Semana(s), Peso: 200,0000 Grama(s).
- 75 Fêmeas de Golden, Idade: 10 Semana(s), Peso: 200,0000 Grama(s).



Mus musculus

- 16 Machos de A, Idade: 8 Semana(s), Peso: 25,0000 Grama(s).
- 16 Fêmeas de A, Idade: 8 Semana(s), Peso: 25,0000 Grama(s).

(Continua)

Anexo 4



Formulário de solicitação de exames do Serviço de Controle da Qualidade Animal/SCQA (ICTB-Fiocruz)

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz		FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE EXAMES						
CÓDIGO	REV.	DATA DE APROVAÇÃO			POP Nº			
FORM-SCQA-081	04	07/08/2018			POP-SCQA-086			
SERVIÇO DE CONTROLE DA QUALIDADE ANIMAL					Nº Registro CEUA: (exames externos)			
Requisitante: (Área/Local/Orgão)				Responsável pela Requisição:				
IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS								
IDI amostra(SCQA)*	IDE AMOSTRA (Solicitante)	Qt. de amostra (SCQA)*	Tipo de Amostra	Origem (Rack/Local)	Espécie	Linhagem	Sexo	Idade
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
			<input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Swab Retal <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Swab Vaginal <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Lavado Retal <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Outros					
Testes Solicitados								
<input type="checkbox"/> Hematologia <input type="checkbox"/> Bioquímica* <input type="checkbox"/> Parasitologia <input type="checkbox"/> Imunologia <input type="checkbox"/> Bacteriologia <input type="checkbox"/> Anatomopatologia <input type="checkbox"/> Monitoramento Sanitário <input type="checkbox"/> Monitoramento Genético								
* Analitos solicitados (preenchimento obrigatório para os casos de análises bioquímicas e hematológicas)								
<input type="checkbox"/> ALB <input type="checkbox"/> ALKP <input type="checkbox"/> ALT <input type="checkbox"/> AST <input type="checkbox"/> BuBc <input type="checkbox"/> CHOL <input type="checkbox"/> Ca <input type="checkbox"/> CK <input type="checkbox"/> Cl <input type="checkbox"/> CREA <input type="checkbox"/> Fe <input type="checkbox"/> PHOS <input type="checkbox"/> GGT <input type="checkbox"/> GLU <input type="checkbox"/> LDH <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> TP <input type="checkbox"/> Na <input type="checkbox"/> TBIL <input type="checkbox"/> BUN <input type="checkbox"/> URIC <input type="checkbox"/> TRI <input type="checkbox"/> LAC <input type="checkbox"/> dHDL								
Sinais clínicos ou observações relevantes								
Dados da requisição (Uso exclusivo do SCQA)*								
Responsável pelo recebimento:				Data/Hora do Recebimento:				
Observações (Uso Exclusivo do SCQA)*								
<small>* Preenchimento exclusivo do SCQA</small> Nota: As amostras enviadas com Grau de Biossegurança acima de NB2 não serão aceitas.								

Anexo 5

Ficha de monitoramento sanitário utilizado na colônia de hamster golden no Serviço de Criação de Roedores e lagomorfos/SCRL (ICTB-Fiocruz)

“Animais-sentinela”

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz	Monitoramento Sanitário - Roedores e Lagomorfos	 ICTB Instituto de Ciência e Tecnologia em Biotecnologia
Espécie / Linhagem:		
Quantidade:	Sexo:	
Data de Nascimento:		
Localização:		
Observações:		
SENTINELA		

Anexo 6

Esquema de representação quantitativa de carga parasitária por cruces

Quantificação da Carga Parasitária		
Exame coproparasitológico	Helmintos/animal	Protozoários
Ovos de helmintos/ lâmina (1)	1-20: +	Oocistos, cistos ou trofozoitos/ lâmina
1-100: +	21-40: ++	1-100: +
	41-60: +++	
101-300: ++	61-80: ++++	101-300: ++
	81-100: +++++	
> 301: +++	> 100: ++++++	> 301: +++

Fonte: FLYNN (1973).

Anexo 7Composição dos meios de cultivo *in vitro* utilizados no estudo

MEIO DE CULTIVO DE DIAMOND'S	
COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Ácido ascórbico	120
Cisteína	600
Extrato de levedura	6000
Fosfato de potássio monobásico	400
Fosfato de potássio dibásico	400
Maltose	3000
Peptona de caseína	1200
Soro bovino inativado	0,1
Água destilada q.s.p.	1L
CALDO PEPTONADO	
COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Cloreto de sódio	3000
Dextrose	25
Extrato de carne	3000
Fosfato dibásico de sódio 12x hidratado	2000
Peptona bacteriológica	10000
Vitamina C Soro bovino inativado	500
Soro bovino inativado	0,1 L
Água destilada q.s.p	1 L

Meio CHD	
COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Bicarbonato de sódio	175
Cisteína	150
Cloreto de cálcio dihidratado	70
Cloreto de potássio	200
Cloreto de sódio	750
Dextrose	506,25
Extrato de carne	750
Extrato de levedura	1550
Fosfato de potássio monobásico	100
Fosfato de sódio monobásico	60
Fosfato dibásico de potássio	130
Fosfato dibásico de sódio 12x hidratado	500
Hidrolisado de lactoalbumina	2500
Maltose	750
Peptona bacteriológica	2500
Peptona de caseína	3000
Sulfato de magnésio hepta hidratado	100
Vermelho de fenol	12
Vitamina C	155
Soro bovino inativado	0,1 L
Água destilada q.s.p	1L

CALDO BHI (Brain Heart Infusion)

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Infusão cérebro e coração	17,5 g/L
Peptona	10,0 g/L
Dextrose	2,0 g/L
Cloreto de sódio	6,0 g/L
Fosfato dissódico	2,5 g/L
Água destilada	q.s.p.
pH final	7.4+/-0,2

LIT (Liver Infusion Triptose)

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
NaCl	4,0 g/L
NaCl	0,4 g/L
Na ₂ HPO ₄	8,0 g/L
Triptose	5,0 g/L
Infuso de fígado	5,0 g/L
H ₂ O destilada	880 ml
Soro bovino	100 ml
Hemoglobina de sangue bovino	20 ml

Caldo Tioglicolato

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Peptona de Caseína	19,5 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Glicose	6,0 g/L
L-cistina	0,5 g/L
Tioglicolato sódio	5,0 g/L
Ágar	0,75 g/L
Água destilada	q.s.p
pH final	7,3 +/- 0,2

Meio Hank's

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L
Bicarbonato de sódio	350
Cloreto de cálcio dihidratado	140
Cloreto de potássio	400
Dextrose	1000
Extrato de levedura	100
Fosfato de sódio monobásico	120
Fosfato dibásico de potássio	60
Hidrolisado de lactoalbumina	5000
Sulfato de magnésio hepta hidratado	200
Vermelho de fenol	24
Soro bovino inativado	0,1L
Água destilada q.s.p	1L

MEIO 199

SAIS ORGÂNICOS	mg/L		
		Biotina	0,01
CaCl ₂ H ₂ O	265	Calciferol	0,10
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	0,72	Pantotenato de cálcio	0,01
MgSO ₄ 7H ₂ O	200	Cloreto de colina	0,50
KCL	400	Ácido fólico	0,01
C ₂ H ₃ O ₂ Na	50	Inositol	0,05
NaCl	6.800	Menadione	0,01
NaHCO ₃	2.200	Ácido nicotínico	0,025
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	125	Niacinamida	0,025
		Ácido p-aminobenzóico	0,050
AMINOÁCIDOS	mg/L	Piridoxal.HCL	0,025
L-alanina	25	Riboflavina	0,01

L-arginina.HCL	70	Tiamina.HCl	0,01
L-ácido aspártico	30	Acetato de retinol	0,14
L-cisteína.HCL.H2O	0,11	Fosfato de tocoferol Na	0,01
L-cistina	26	OUTROS COMPONENTES	mg/L
L-ácido glutâmico	75	Adenina sulfato	10
L-glutamina	100	Adenosina trifosfato -2 Na	1
Glicina	50	Adenosina monofosfato -Na	0,20
L-histidina.HCL.H2O	21,88	Colesterol	0,20
hidroxiprolina	10	Deoxiribose	0,50
L-isoleucina	20	Glicose	1000.00
L-lisina.HCL	70	Glutathione	0,050
L-fenilalanina	25	Guanina.HCL	0,30
L-leucina	60	Hipoxantina	0,30
L-metionina	15	Vermelho de fenol	20
L-prolina	40	Ribose	0,50
L-serina	25	Xantina Na	0,344
L-treonina	30	Timina	0,30
L-triptofano	10	Tween80	20
L-tirosina	57,70	Uracil	0,30
L-valina	25		
VITAMINAS	mg/L		
Ácido ascórbico	0,050		