

## Efeitos da ciclosporina A e betametasona na toxocaríase murina experimental

### Effects of cyclosporin A or betamethasone on experimental murine toxocariasis

Susana A. Zevallos Lescano<sup>1</sup>, Pedro Paulo Chieffi<sup>1,2</sup>, Denise Katia Ikai<sup>1</sup> e Manoel Carlos S. A. Ribeiro<sup>2</sup>

#### RESUMO

*Estudou-se o efeito de ciclosporina A ou betametasona em camundongos experimentalmente infectados por larvas de Toxocara canis administrados 15 dias antes ou 45 dias após infecção por esse ascarídeo. Nos animais infectados determinou-se a cinética da resposta humoral por IgG 60 e 90 dias após infecção por meio de pesquisa de anticorpos anti-Toxocara, utilizando teste imunoenzimático, em amostras de sangue obtidas por punção do plexo orbitário. No 90º dia após a infecção todos os animais sobreviventes foram sacrificados e submetidos a digestão ácida da carcaça, pulmões, fígado e cérebro para recuperação de larvas de Toxocara canis encistadas nesses órgãos. Observou-se retardo na produção de anticorpos IgG anti-Toxocara nos animais tratados com ciclosporina A ou betametasona 15 dias antes da infecção, além de aumento significativo na quantidade de larvas de Toxocara canis recuperadas no grupo de animais que foi tratado com ciclosporina A 15 dias antes da infecção pelo ascarídeo.*

*Palavras-chaves:* Toxocara canis. Toxocaríase experimental. Camundongos. Ciclosporina A. Betametasona.

#### ABSTRACT

*The effects of administration of either cyclosporin A or betamethasone 15 days before or 45 days after experimental infection with Toxocara canis on mice had been studied. The dynamics of IgG antibody production, employing an enzyme-linked immunosorbent assay, was studied 60 and 90 days after mice infection by Toxocara canis. In the 90<sup>th</sup> day after infection all surviving mice were sacrificed and the tissue trapped larvae recovered by acid digestion in the muscles, lungs, liver and brain. A significant delay in the production of IgG antibodies anti-Toxocara was observed in all the mice treated with cyclosporin A or betamethasone 15 days before infection. On the other side, mice treated with cyclosporine 15 days before infection, but not with betamethasone, showed a significant higher number of trapped Toxocara canis larvae in the examined tissues.*

*Key-words:* Toxocara canis. Experimental toxocariasis. Mice. Cyclosporin A. Betamethasone.

*Toxocara canis* é um ascarídeo parasita do intestino delgado de cães, com distribuição cosmopolita<sup>2 12 16</sup>. Seres humanos e outros mamíferos quando infectados por larvas de *T. canis* comportam-se como hospedeiros paratênicos, não permitindo o desenvolvimento completo do helminto. As larvas, contudo, podem sobreviver por longos períodos no organismo humano, realizando migrações por órgãos e tecidos, após o que permanecem encistadas e viáveis, podendo determinar manifestações clínicas diversas, que caracterizam a síndrome de larva migrans visceral, a larva migrans ocular e a toxocaríase oculta<sup>16 17</sup>.

A frequência de infecção de seres humanos por esse ascarídeo, determinada pela pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* no soro, é

bastante variável, porém tem sido assinalada onde quer que tenha sido pesquisada, com taxas que oscilam de 1% na Espanha<sup>14</sup> a 86% em Santa Lúcia<sup>18</sup>. No Brasil Chieffi et al<sup>6</sup> encontraram índice de positividade de 3,7% entre 2.025 indivíduos examinados em cinco municípios do Estado de São Paulo.

No presente trabalho, procura-se determinar, em camundongos experimentalmente infectados por *T. canis*, o efeito de ciclosporina A e betametasona, drogas freqüentemente utilizadas no controle de rejeição em transplantes e em outras situações clínicas que demandem modulação da resposta imunitária. Estudou-se a cinética da resposta humoral e a recuperação de larvas de *Toxocara canis*, em órgãos e musculatura, 90 dias após a infecção.

1. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (LIM06) da Universidade de São Paulo. 2. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP.

Endereço para correspondência: Dr. Pedro Paulo Chieffi. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil. e-mail: pchieffi@usp.br

Recebido para publicação em 7/10/2002

Aceito em 6/12/2003

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 90 camundongos BALB/c, fêmeas, com cerca de 8 semanas, divididos em sete grupos:

- G1: 10 camundongos infectados com *Toxocara canis*.
- G2: 10 camundongos tratados com ciclosporina A, sem infecção.
- G3: 10 camundongos tratados com betametasona, sem infecção.
- G4: 15 camundongos tratados com ciclosporina A 15 dias antes de infecção com *T. canis*.
- G5: 15 camundongos tratados com ciclosporina A 45 dias após infecção com *T. canis*.
- G6: 15 camundongos tratados com betametasona 15 dias antes de infecção com *T. canis*.
- G7: 15 camundongos tratados com betametasona 45 dias após infecção com *T. canis*.

Cada camundongo dos grupos G1, G4, G5, G6 e G7 recebeu, por meio de sonda esofágica, 300 ovos larvados de *T. canis*, obtidos por dissecação de fêmeas do helminto e após permanência mínima de 30 dias em solução de formol a 2%, à temperatura de 28°C. Os animais dos grupos G2, G4 e G5 foram tratados com ciclosporina A, por via oral (50mg/kg/dia), durante 8 dias. Os pertencentes aos grupos G3, G6 e G7 receberam, por via subcutânea, 1mg/kg/dia de betametasona, durante 8 dias.

Os animais foram sangrados por punção do plexo orbitário com 60 e 90 dias após infecção por *T. canis*. No caso dos camundongos dos grupos G2 e G3 considerou-se como início do experimento o primeiro dia de tratamento. Os soros obtidos foram processados por técnica imunoenzimática (ELISA) para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara*, empregando-se antígeno de excreção-secreção extraído de larvas de *T. canis*, conforme técnica descrita por Glickman et al<sup>9</sup> e adaptada por Chieffi et al<sup>5</sup>. Para calcular o limiar de reatividade utilizaram-se soros de camundongos não infectados por *T. canis*, mantidos em estoque.

Noventa dias após início do experimento os animais sobreviventes foram sacrificados e realizou-se recuperação de larvas de *T. canis* no pulmão, fígado, cérebro e carcaça, segundo técnica descrita por Xi & Jin<sup>19</sup>.

Os dados obtidos foram analisados por meio de testes estatísticos não paramétricos (Kruskal-Wallis e qui-quadrado), utilizando-se nível de significância de 5% (p=0,05).

## RESULTADOS

As Tabelas 1 e 2 mostram a evolução dos níveis de anticorpos anti-*Toxocara* observados nos soros dos camundongos dos diversos grupos experimentais, obtidos 60 e 90 dias após infecção por *T. canis*.

O número médio de larvas de *T. canis* recuperadas no pulmão, fígado, cérebro e carcaça dos animais dos grupos G1, G4, G5, G6 e G7 após digestão com ácido clorídrico está expresso na Tabela 3.

Tabela 1 - Valores da densidade óptica (média, desvio-padrão e mediana) obtidos por teste imunoenzimático nos soros de camundongos dos grupos controle e experimentais 60 dias após infecção por *Toxocara canis*.

Grupos	Densidade óptica (nm) 60 dias			p*
	média	desvio-padrão	mediana	
G1	0,87	0,17	0,89	-
G4	0,05	0,005	0,06	<0,05
G5	0,72	0,16	0,76	>0,05
G6	0,06	0,005	0,06	<0,05
G7	0,88	0,14	0,84	>0,05

G1= controle; G4= ciclosporina A 15 dias antes da infecção; G5= ciclosporina A 45 dias após a infecção; G6= betametasona 15 dias antes da infecção; G7= betametasona 45 dias após a infecção

\* Os valores de p foram obtidos considerando as diferenças entre os grupos experimentais e o controle

Tabela 2 - Valores da densidade óptica (média, desvio-padrão e mediana) obtidos por teste imunoenzimático nos soros de camundongos dos grupos controle e experimentais 90 dias após infecção por *Toxocara canis*.

Média	Densidade óptica (nm) 90 dias			p*
	Média	Desvio-padrão	Mediana	
G1	0,84	0,17	0,82	-
G4	0,64	0,10	0,67	>0,05
G5	0,88	0,07	0,87	>0,05
G6	0,45	0,08	0,47	<0,05
G7	0,79	0,32	0,90	>0,05

G1= controle; G4= ciclosporina A 15 dias antes da infecção; G5= ciclosporina A 45 dias após a infecção;

G6= betametasona 15 dias antes da infecção; G7= betametasona 45 dias após a infecção

\* Os valores de p foram obtidos considerando as diferenças entre os grupos experimentais e o controle

Tabela 3 - Número médio de larvas de *Toxocara canis* recuperadas após digestão da carcaça, pulmões, fígado e cérebro com ácido clorídrico

Grupo	No. médio	Desvio-padrão	p*
G1	43,81	16,48	-
G4	134,00	50,33	<0,05
G5	33,60	9,23	>0,05
G6	69,20	48,46	>0,05
G7	58,00	23,15	>0,05

G1= controle; G4= ciclosporina A 15 dias antes da infecção; G5= ciclosporina A 45 dias após a infecção;

G6= betametasona 15 dias antes da infecção; G7= betametasona 45 dias após a infecção

\* Os valores de p foram obtidos considerando as diferenças entre os grupos experimentais e controle

## DISCUSSÃO

Ciclosporina A e betametasona são drogas com marcado efeito imunossupressor que, com frequência, são utilizadas em esquemas terapêuticos para diversas situações clínicas, destacando-se o controle de processos de rejeição em pacientes submetidos a transplantes de órgãos.

No caso da ciclosporina A, além da atividade imunossupressora, tem sido assinalada ação antiparasitária em diversos modelos experimentais<sup>3 4 7 8 10 11</sup>. Palau & Pankey<sup>15</sup> acreditam que em pacientes submetidos a transplante renal o uso de ciclosporina A pode ser responsável pela diminuição de casos de hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*, a exemplo do que foi verificado experimentalmente em camundongos<sup>1</sup>.

Não se conhece completamente o mecanismo pelo qual a ciclosporina A exerce ação antiparasitária. Sua ação imunossupressora depende de ligação com receptor intracelular denominado ciclofilina<sup>15</sup> porém, como outras drogas análogas à ciclosporina A, que não utilizam o mesmo receptor, apresentam efeito anti-helmíntico semelhante ao da ciclosporina A no modelo representado por camundongos-*Hymenolepis microstoma*<sup>11</sup> supõe-se que o mecanismo de ação antiparasitária seja diverso.

Camundongos e outros murídeos comportam-se como hospedeiros paratênicos quando infectados por larvas de *T. canis*, constituindo modelo adequado para estudo das relações hospedeiro-parasita na síndrome de larva migrans visceral, uma vez que reproduzem, a grosso modo, os fenômenos que ocorrem em seres humanos infectados por esse ascarídeo.

Os resultados do presente trabalho sugerem ausência de efeitos deletério ou sinérgico da ciclosporina A ou betametasona sobre larvas de *Toxocara canis*, quando administradas a camundongos previamente infectados pelo ascarídeo. No caso da betametasona a mesma ausência de efeitos foi observada quando se administrou a droga 15 dias antes da infecção; entretanto, quando a droga utilizada previamente foi a ciclosporina A verificou-se significativo aumento da quantidade de larvas recuperadas nos tecidos após digestão ácida (Tabela 3), indicando diminuição da capacidade de eliminação espontânea de parcela da carga parasitária, podendo resultar em infecção mais grave nesse caso, com predominância do efeito imunossupressor sobre a ação anti-parasitária da droga, ao contrário do que fora observado por El-Ganayni & Handousa<sup>7</sup> anteriormente.

Com relação à produção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* observou-se nítido retardo em seu surgimento nos animais tratados com ciclosporina A ou betametasona 15 dias antes da infecção por *Toxocara canis* (Tabelas 1 e 2), porém o mesmo não se verificou nos grupos que receberam essas drogas 45 dias após serem infectados. Deve-se ressaltar, entretanto, que quando se considerou o resultado qualitativo da reação imunoenzimática (teste positivo ou negativo), 90 dias após a infecção, os camundongos de todos os grupos experimentais, assim como os do grupo controle, mostraram resultados semelhantes com relação ao nível de anticorpos anti-*Toxocara*, revelando igualmente a presença da infecção.

Tais resultados indicam que o efeito anti-helmíntico da ciclosporina A não consegue sobrepujar os efeitos imunodepressores quando essa droga é administrada previamente à infecção por *T. canis* e, por outro lado, sugere que o emprego de ambas as drogas testadas não interferiria de forma significativa com os processos habitualmente empregados no diagnóstico laboratorial da síndrome de larva migrans visceral em seres humanos, nos casos de infecção crônica, isto é, com mais de 60 dias de evolução.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armson A, Cunningham GA, Grubb WB, Mendis AH. Murine strongyloidiasis: the effects of cyclosporin A and thiabendazole administered singly and in combination. *International Journal for Parasitology* 25: 533-535, 1995.
2. Barriga OO. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocaríasis and the possibilities of immunological control. *Veterinary Parasitology* 29: 195-234, 1988.
3. Bell A, Roberts HC, Chappell LH. The antiparasite effects of cyclosporin A: possible drug targets and clinical applications. *General Pharmacology* 27: 963-971, 1996.
4. Chappell LH, Wastling JM. Cyclosporin A: antiparasite drug, modulator of the host-parasite relationship and immunosuppressant. *Parasitology* 105: 525-540, 1992.
5. Chieffi PP, Peres BA, Mello EO, Kanamura H, Brandão M. Persistence of specific antibody response in different experimental infection of mice with *Toxocara canis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 37: 187-190, 1995.
6. Chieffi PP, Ueda M, Camargo ED, Souza AM, Guedes MLS, Gerbi LJ, Spir M, Moreira AS. Visceral larva migrans: a seroepidemiological survey in five municipalities of São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 32: 204-210, 1990.
7. El-Ganayni GA, Handousa AE. The effect of cyclosporin A (CSA) on murine visceral toxocaríasis canis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 22: 487-494, 1992.
8. Gargione C, Velloso SAG, Shimizu SH, Okumura M, Chiodelles SG. Immunosuppression and parasitic diseases: experimental *Schistosoma mansoni*. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, 53: 122-128, 1998.
9. Glickman LT, Schantz PM, Dombroske R, Cypess R. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27: 492-498, 1978.
10. Hurd H, Mackenzie KS, Chappell LH. Anthelmintic effects of cyclosporin A on protoscoleces and secondary hidatid cysts of *Echinococcus granulosus* in the mouse. *International Journal for Parasitology* 23: 315-320, 1993.
11. McLauchlan PE, Roberts HC, Chappell LH. Mode of action of cyclosporin A against *Hymenolepis microstoma* (Cestoda): relationship between cyclophilin binding and drug-induced damage. *Parasitology* 121: 661-670, 2000.
12. Overgaauw PAM. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Critical Review in Microbiology* 23: 233-251, 1997.
13. Palau LA, Pankey GA. *Strongyloides* hyperinfection in a renal transplant recipient receiving cyclosporine: possible *Strongyloides stercoralis* transmission by kidney transplant. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57: 413-415, 1997.
14. Portus M, Riera C, Prats G. A serological survey of toxocaríasis in patients and healthy donors in Barcelona (Spain). *European Journal of Epidemiology* 5: 224-227, 1989.
15. Ryffel B. Cyclosporin binding proteins. Identification, distribution, function and relation to FK binding proteins. *Biochemical Pharmacology* 46: 1-12, 1993.
16. Schantz PM. *Toxocara* larva migrans now. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41: 21-34, 1989.
17. Taylor MRH, Keane CT, O'Connor P, Girdwood RWA, Smith H. Clinical features of covert toxocaríasis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 19: 693-696, 1987.
18. Thompson DE, Bundy DAP, Cooper ES, Schantz PM. Epidemiological characteristics of *Toxocara canis* zoonotic infection of children in a Caribbean community. *Bulletin of the World Health Organization* 64: 283-290, 1986.
19. Xi WG, Jin LZ. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *Journal of Helminthology* 72: 183-184, 1998.