

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (2003) 40 (supl): 191-198
ISSN printed: 1413-9596
ISSN on-line: 1678-4456

Avaliação da eficácia do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum*

Evaluation of the efficacy of hyperimmune bovine colostrum on *Cryptosporidium parvum* experimental infection of rodents

Vicente José Salles de ABREU¹;
Ary Lopes CARDOSO¹;
Hilda Fátima de Jesus PENA²;
Solange Maria GENNARI²;
Idécio SINHORINI³;
Sueli Blanes DAMY⁴

1- Unidade de Nutrição e Metabolismo do Instituto da Criança "Pedro de Alcântara" da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo - SP
2- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP
3- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP
4- Centro de Bioterismo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo - SP

Resumo

O colostro bovino hiperimune contém alta concentração de anticorpos anti- *Cryptosporidium parvum*. Este produto é considerado como uma das estratégias terapêuticas promissoras no controle da criptosporidiose intestinal em humanos. Com o objetivo de avaliar a eficácia do colostro bovino hiperimune na redução do parasitismo e na prevenção de alterações de mucosa intestinal, foram infectados, experimentalmente, com oócistos de *Cryptosporidium parvum*, vários ratos (F344) e camundongos (C57BL/6). Os resultados mostraram que o colostro bovino hiperimune apresentou altos títulos de anticorpos. Os ratos F344, tratados com colostro bovino hiperimune ou com colostro normal, tiveram redução no parasitismo intestinal e apresentaram menor comprometimento de sua mucosa. Os camundongos C57BL/6, quando tratados com colostro hiperimune ou normal, apresentaram ligeira redução do parasitismo intestinal e não evidenciaram diferenças estatísticas significantes nas alterações histopatológicas da mucosa. Conclui-se que o uso do colostro bovino hiperimune tenha um benefício limitado na infecção causada pelo *Cryptosporidium parvum*.

Palavras-chave:
Colostro.
Modelos animais de doenças.
Cryptosporidium parvum.
Roedores.
Ratos endogâmicos F344.

Correspondência para:

VICENTE JOSÉ SALLES DE ABREU
Unidade de Nutrição e Metabolismo do
Instituto da Criança "Pedro de Alcântara"
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647
05403-900 - São Paulo - SP
vicabreu@aol.com

Recebido para publicação: 08/08/2002
Aprovado para publicação: 19/02/2004

Introdução

O *Cryptosporidium* spp. foi descrito inicialmente por Tyzzer em 1907 como um protozoário presente nas glândulas gástricas de camundongos assintomáticos. Não foi associado à doença em animais até 1955, quando Slavin atribuiu-lhe o papel de agente causal da diarreia em perus. Posteriormente, o *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) foi responsabilizado como agente causador de diarreia em bovinos, ovinos, suínos e outros animais domésticos e silvestres. Em 1971,

Panciera, Thomassen e Garden¹ associaram esse coccídeo à diarreia bovina. Os primeiros dois casos de criptosporidiose em humanos foram relatados em 1976 por dois diferentes grupos.^{2,3} A partir de 1982, o relato de pessoas infectadas pelo *Cryptosporidium parvum* aumentou proporcionalmente ao registro crescente de pacientes com Aids.

Até o presente, não há terapia eficaz contra a criptosporidiose. O colostro bovino hiperimune anti-*C. parvum* (CBH) neutralizou a infectividade de esporozoítas *in vitro* e impediu o estabelecimento de infecção

experimental com *Cryptosporidium parvum* em camundongos BALB/c e em vacas.^{4,5,6,7,8,9,10,11} A principal imunoglobulina presente no CBH é a IgG₁^{12,13}.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do colostro hiperimune na redução do parasitismo intestinal e na prevenção de alterações da mucosa intestinal em roedores experimentalmente infectados com *Cryptosporidium parvum*.

Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FM-USP, nº 272/00 em 13/09/2000.

Para a obtenção dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram utilizados dois bezerros machos, da raça holandesa, com exames parasitológicos negativos. Cada animal foi inoculado oralmente com $3,5 \times 10^7$ oocistos de *Cryptosporidium parvum* obtidos a partir de uma vaca naturalmente infectada. Desde o 1º dia de inoculação adaptou-se um saco plástico de coleta de fezes na região posterior dos animais. As fezes foram colhidas a partir do 3º ou 4º dia pós-inoculação (dpi) até o 11º, quando então diminuiu a eliminação de oocistos. As fezes foram homogeneizadas em água destilada e tamisadas com coador de chá comum para eliminar debris grosseiros, sendo então estocadas em solução de dicromato de potássio 2%, a 4°C¹³. O antígeno foi preparado purificando-se os oocistos dessas fezes. Posteriormente, esses oocistos foram lavados e armazenados a 4°C. Segundo a contagem de oocistos obtida, o "pellet" foi assepticamente aliquotado em tubos de "ependorf", na dose vacinal de $2,0 \times 10^7$ oocistos/"ependorf", sendo armazenados em "freezer" a -20°C, até sua utilização.

Os colostros foram preparados a partir da hiperimunização de cinco vacas da raça holandesa, múltiparas e em gestação com sorologias negativas para toxoplasmose, brucelose e tuberculose. A dose vacinal foi preparada na concentração de $2,0 \times 10^7$

oocistos por imunização. As vacas receberam injeções 10 semanas antes do parto (SAP) por via intramuscular e, posteriormente, por via intramamária, na 8, 6 e 4 SAP.¹⁴ Todos os colostros foram colhidos imediatamente após o parto e posteriormente, analisados pelo teste de ELISA para titulação de anticorpos anti-*Cryptosporidium parvum*^{7,13,15}. Os colostros foram mantidos congelados a -20°C até a sua utilização.

Na tabela 1 são apresentados os títulos de anticorpos, ou seja, as diluições até onde foram detectados pelo ELISA os anticorpos para *Cryptosporidium parvum* nas 5 amostras de colostro obtidas. O animal controle não foi imunizado.

Os camundongos receberam a dose de 1×10^6 oocistos de *Cryptosporidium parvum* diluída em 10 ml de solução salina tamponada (PBS) e os ratos a dose de 2×10^6 oocistos de *Cryptosporidium parvum* em 20 ml de PBS. A inoculação foi realizada por via oral, utilizando-se uma ponteira de polipropileno acoplada a uma micropipeta. A dose administrada baseou-se nos trabalhos de Ungar et al.¹⁶ e Mead et al.¹⁷, que verificaram que a menor dose capaz de infectar 100% dos camundongos é de 10^6 oocistos.

Foram utilizados 40 camundongos C57BL/6 e 37 ratos F344, isogênicos, com idade variando de 2 a 4 dias de vida e originários do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos utilizados neste trabalho foram realizados de acordo com princípios éticos estabelecidos pelo COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.¹⁸

Os animais foram distribuídos em 4 grupos:

- grupo controle positivo: animais inoculados com oocistos de *Cryptosporidium parvum* e que não receberam colostro posteriormente;
- grupo controle negativo: animais não inoculados com oocistos e que não receberam colostro posteriormente;
- grupo colostro normal: animais

inoculados com oocistos de *Cryptosporidium parvum* e que receberam colostro normal no 4º e 5º dpi ;

- grupo colostro hiperimune: animais inoculados com oocistos de *Cryptosporidium parvum* e que receberam colostro hiperimune no 4º e 5º dpi.

Todos os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ no 6º dpi. As amostras obtidas do intestino delgado, ceco e intestino grosso foram conservadas em solução de formol a 10%, coradas com hematoxilina-eosina e fixadas em parafina. A análise histológica foi feita em microscopia ótica de luz branca com objetiva de 40x, com aumento final de 140x (Microscópio Olympus™). O parasitismo intestinal e a arquitetura da mucosa intestinal foram avaliados pelo pesquisador e pelo patologista. Ao todo foram analisadas 160 lâminas e foram feitas 2 contagens de campo/lâmina. O parasitismo foi verificado pela contagem do número de oocistos de *Cryptosporidium parvum*/campo (o/c) no terço distal da mucosa do intestino delgado. Os examinadores observaram a integridade da mucosa intestinal. Posteriormente, de acordo com o grau de comprometimento observado, foi instituído um escore morfológico. Não foram registradas medidas específicas do comprometimento das vilosidades. O escore foi realizado com base na análise histológica do patologista e do pesquisador realizadas em separado. Quando houvesse diferença de resultado, o patologista reavaliava as lâminas para obter o escore. Assim, para a mucosa intestinal normal – escore morfológico de 0; havendo leve comprometimento de mucosa, ou seja, quando as vilosidades exibissem discreta descamação superficial e leve encurtamento das pontas - escore morfológico de 1; havendo moderado comprometimento, ou seja, quando as vilosidades apresentassem encurtamento de aproximadamente 50% de seu comprimento normal – escore morfológico de 2; havendo grave comprometimento da mucosa intestinal, com deslocamento, ausência ou achatamento

quase total das vilosidades – escore morfológico 3.

A análise estatística consistiu de análise de variância (ANOVA) com pós-teste Student-Newman-Keuls *test*, com nível de significância < 1%; teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de DMS (diferença mínima significativa).

Tabela 1

Resultados do ELISA nos diferentes colostros - São Paulo, 2001

Vaca	diluição
Controle	1/ 25.000
1	1/ 500.000
2	1/ 100.000
4	1/ 250.000
5	1/ 100.000

* animal não imunizado, colostro normal

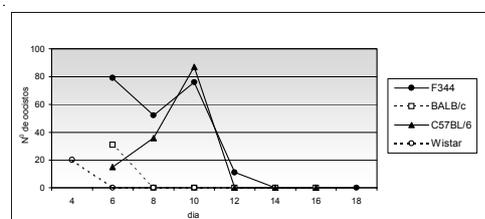


Figura 1

Curva de parasitismo intestinal de roedores infectados experimentalmente com oocistos de *Cryptosporidium parvum*

Resultados

A figura 1 exhibe a curva de parasitismo intestinal em algumas linhagens de roedores em que se estudou a infecção causada pelo *Cryptosporidium parvum*. Como os ratos F344 e os camundongos C57BL/6 recém-nascidos exibiram um tempo maior de parasitismo intestinal verificado através da presença de oocistos na mucosa intestinal, essas linhagens foram consideradas as mais apropriadas para prosseguir o experimento.

A tabela 2 apresenta a média do número de oocistos do *Cryptosporidium parvum* evidenciada na mucosa do intestino delgado dos ratos F344 e dos camundongos C57BL/

6 infectados experimentalmente. Pode-se observar que quando os animais foram infectados e não receberam qualquer um dos colostros (grupo controle positivo), os ratos F344 exibiram maior média de oocistos que os camundongos C57BL/6. Quando os animais receberam algum tipo de colostro, o parasitismo foi menor nos ratos F344 do que nos camundongos C57BL/6. Entre os animais F344, aqueles que receberam colostro normal tiveram menor parasitismo que os tratados com colostro hiperimune. Entre os camundongos C57BL/6 não houve diferenças significantes entre os diferentes grupos de tratamento.

A tabela 3 apresenta o escore morfológico dos ratos F344 e dos camundongos C57BL/6 infectados experimentalmente com oocistos de *Cryptosporidium parvum*. A morfologia da mucosa intestinal esteve mais preservada nos

ratos F344 do que nos camundongos C57BL/6. Contudo, em ambas as linhagens de roedores não houve diferenças significativas na arquitetura da mucosa intestinal com o emprego do colostro normal ou do hiperimune.

Os resultados, apresentados nas tabelas 2 e 3, mostram que os ratos F344 comparativamente aos camundongos C57BL/6, quando infectados com *Cryptosporidium parvum*, apresentam maior média de oocistos na mucosa intestinal e têm a arquitetura de mucosa mais preservada quando recebem colostro bovino normal ou hiperimune.

Discussão

Alguns pesquisadores observaram que o colostro bovino normal e sua fração solúvel (soro) freqüentemente têm baixos

Tabela 2

Média de oocistos na mucosa intestinal dos animais infectados experimentalmente com *Cryptosporidium parvum* e submetidos a diferentes tratamentos - São Paulo, 2001

CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO	COLOSTRO NORMAL	COLOSTRO HIPERIMUNE
Ratos F344			
n = 7	n = 7	n = 12	n = 11
59 †	0 *	1 *	14,5 * †
± 19,6	± 0	± 3,4	± 13,7
NOVA - p = 0,0001 com * p<0,01 vs CONTROLE POSITIVO e † p<0,01 vs COLOSTRO NORMAL			
Camundongos C57BL/6			
n = 11	n = 8	n = 10	n = 11
37,4	0*	22,7	27
± 18,9	± 0	± 22,6	± 21,5
NOVA - p = 0,002 com * p<0,01 vs CONTROLE POSITIVO e † p<0,01 vs COLOSTRO NORMAL			
Dados expressos em média e desvio-padrão			
Análise de Variância para medidas não repetidas			
Pós-teste de contraste de Student-Neuman-Keuls			

n = tamanho da amostra

títulos de anticorpos anti-*Cryptosporidium parvum*, além de conter citocinas com atividade anti-*Cryptosporidium parvum*. Esse colostro possui também fatores microbicidas não relacionados às imunoglobulinas e podem reduzir, de maneira inespecífica, a infecção causada pelo *Cryptosporidium parvum*. Esses fatores, presentes no colostro, correspondem aos linfócitos T e B, leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fatores biologicamente ativos como vitaminas, prostaglandinas, lactoferrina e complemento. Essas substâncias são capazes de modular uma resposta imunológica.^{6,8,19,20} Estes fatos podem explicar o porquê de o parasitismo intestinal ter diminuído nos animais infectados experimentalmente com o *Cryptosporidium parvum* quando receberam

colostro bovino normal. O fato de o colostro hiperimune não apresentar um resultado melhor do que o colostro normal poderia sugerir, em uma primeira análise, que os anticorpos, presentes no produto hiperimune, não fossem protetores. Isso poderia advir do protocolo de preparo do inóculo vacinal. Assim, os anticorpos do colostro hiperimune para o *Cryptosporidium parvum* teriam um menor efeito neutralizante, uma vez que esses anticorpos não reconheceriam os epítomos do antígeno. Entretanto, o protocolo de produção de anticorpos seguiu a metodologia indicada por Fayer, Guidry e Blagburn⁷ e o teste de ELISA demonstrou alta concentração de anticorpos. É importante lembrar que o protocolo de produção de colostro bovino hiperimune estimula a resposta humoral,

Tabela 3

Escore morfológico em animais infectados experimentalmente com oocistos de *Cryptosporidium parvum* e submetidos a diferentes tratamentos - São Paulo, 2001

CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO	COLOSTRO NORMAL	COLOSTRO HIPERIMUNE
Ratos F344			
n = 7	n = 7	n = 12	n = 11
2,6	0*†	1,2	1,4
± 1,1	± 0	± 0,7	± 1,1
KRUSKAL-WALLIS - p = 0,0001 com * p<0,01 vs CONTROLE POSITIVO e † p<0,01 vs COLOSTRO NORMAL.			
Camundongos C57BL/6			
n = 11	n = 8	n = 10	n = 11
3	0	3	3
± 0	± 0	± 0	± 0
KRUSKAL-WALLIS - p = 0,0001 com * p<0,01 vs CONTROLE POSITIVO e † p<0,01 vs COLOSTRO NORMAL.			
Dados expressos em média e desvio-padrão			
Análise de Variância para medidas não repetidas			
Pós-teste de duas amostras de Kolmogorov-Smirnov			

n = tamanho da amostra

Escore morfológico - 0: morfologia intestinal normal; 1: leve atrofia vilositária; 2: moderada; 3: intensa

mediada por imunoglobulinas e a resolução da criptosporidiose se deve principalmente à resposta celular. Portanto, o CBH não traria benefício adicional na resolução da infecção intestinal de roedores. Arrowood et al.²¹ verificaram que os camundongos lactantes de mães com história de infecção prévia com *Cryptosporidium parvum*, desenvolveram infecção quando foram inoculados com esses parasitas. Esses autores concluíram que somente os anticorpos não foram suficientes para proteger os animais contra esta infecção. Taghi-Kilani, Sekla e Hayglass²² também investigaram o papel da resposta imune-humoral ativa no controle da infecção com *Cryptosporidium parvum* em camundongos BALB/c recém-nascidos. Os autores encontraram uma baixa produção de anticorpos IgG e IgM e os níveis de anticorpos não se correlacionaram com a duração ou a quantidade de excreção de oocistos. Esses estudiosos concluíram que, em camundongos, a ativação de respostas com anticorpos à infecção com *Cryptosporidium parvum* não tem um papel importante na resolução da infecção com *Cryptosporidium parvum*. Por outro lado, Hill, Dawson e Blewet¹⁹ empregaram anticorpos monoclonais em modelo experimental. Esses autores queriam determinar se a exposição ao componente IgG purificado do soro hiperimune de ovelhas poderia neutralizar os esporozoítas do *C. parvum* no epitélio intestinal de ratos. Os pesquisadores observaram que a IgG específica era capaz de neutralizar a infectividade desses esporozoítas.

Em nosso trabalho, a infecção ocorreu na porção terminal do íleo e na porção proximal do cólon. Este achado coincide com o descrito por outros autores.^{23,24} Uma possibilidade de o colostro hiperimune de nosso experimento não ter apresentado um resultado melhor, pode ser devido ao fato de estágios intra-celulares do parasita não terem sido neutralizados pelo colostro. O *Cryptosporidium parvum* é um parasita intra-celular, aderente à superfície do enterócito, encistado entre as

microvilosidades e fechado em um vacúolo parasitário.^{25,26,27} Está bem documentada a autoinfecção desencadeada por diversos estágios do ciclo de vida desse parasita.²⁸ Saxon e Weinstein²⁹ não observaram resposta com o uso de colostro hiperimune em um pequeno grupo de pacientes com criptosporidiose intestinal. Esses autores atribuíram o insucesso terapêutico ao fato de haver formas endógenas do parasita e não terem localização exclusiva na luz intestinal. Por outro lado, vários trabalhos demonstram que os anticorpos neutralizantes do colostro bovino hiperimune estão dirigidos contra os determinantes antigênicos conhecidos de oocistos do *Cryptosporidium parvum* e também contra epítomos presentes em outros estágios evolutivos do parasita.^{4,10,12,15,25,27,30,31,32,33,34} Perryman et al.⁹ observaram eficácia do colostro hiperimune quando usado antes da infecção com *Cryptosporidium parvum*. Os autores acreditam que a rápida neutralização dos esporozoítas dentro do lúmen intestinal, antes de ocorrer a infecção das células epiteliais, seria importante para reduzir a intensidade da infecção inicial após a ingestão dos oocistos e em diminuir a autoinfecção causada pelos esporozoítas liberados na célula infectada do hospedeiro. Naciri et al.³⁵ realizaram estudo da eficácia do colostro hiperimune em ovelhas com criptosporidiose. Estes autores obtiveram uma redução dos casos de criptosporidiose quando forneceram o colostro profilaticamente, ou seja, antes da inoculação dos oocistos.

Conclusões

A partir de nossos resultados e da literatura acumulada sobre o assunto, em sua maioria com modelos murinos, pode-se concluir que o benefício do colostro bovino hiperimune é limitado. Os trabalhos mais otimistas evidenciam um efeito protetor do produto quando usado profilaticamente. Este benefício preventivo do colostro nos parece de pouco valor na prática clínica.

Abstract

The hyperimmune bovine colostrum has a high concentration of antibodies anti-*Cryptosporidium parvum*. This product is considered one of the promising therapeutic strategies in the control of intestinal cryptosporidiosis in humans. With the purpose to evaluate the hyperimmune bovine colostrum efficacy in reducing the parasitism and preventing intestinal mucosa alterations, several strains of rats F344 and mice were experimentally infected with *Cryptosporidium parvum* oocysts. The results showed that the hyperimmune bovine colostrum had high levels of antibodies. The rats F344, treated either with hyperimmune or normal bovine colostrum, had reduction of the intestinal parasitism and presented little mucosa compromise. The mice C57BL/6 when treated either with hyperimmune or normal colostrum had slight reduction of the intestinal parasitism and evidenced no statistical significant differences in the histopathological mucosa changes. In conclusion, the use of hyperimmune bovine colostrum has a limited benefit in *Cryptosporidium parvum* infection.

Key-words:

Colostrum.
Diseases animal models.
Cryptosporidium parvum.
Rodents.
F344 endogamic rats.

Referências

- PANCIERA, R.; THOMASSEN, R.; GARNER, F. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v. 8, p. 479-484, 1971.
- MEISEL, J. et al. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v. 70, n. 6, p. 1156-1160, 1976.
- NIME, F. et al. Acute enterocolitis in a human infected with the protozoan *cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, n. 4, p. 592-598, 1976.
- DOYLE, P.; CRABB, J.; PETERSEN, C. Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity *in vitro* and *in vivo*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4079-4084, 1993.
- FAYER, R.; PERRYMAN, L.; RIGGS, M. Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 1, p. 151-153, 1989a.
- FAYER, R.; ANDREWS, C.; UNGAR, B.; BLAGBURN, B. Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 3, p. 393-397, 1989b.
- FAYER, R.; GUIDRY, A.; BLAGBURN, B. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, p. 2962-2965, 1990.
- FLANIGAN, T. et al. *In vitro* Screening of therapeutic agents against *Cryptosporidium*: hyperimmune cow colostrum is highly inhibitory. **Journal of Protozoology**, v. 38, n. 6, p. 225S-227S, 1991.
- PERRYMAN, L. et al. Kinetics of *Cryptosporidium parvum* sporozoite neutralization by monoclonal antibodies, immune bovine serum, and immune bovine colostrum. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 1, p. 257-259, 1990.
- RIGGS, M.; PERRYMAN, L. Infectivity and neutralization of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 9, p. 2081-2087, 1987.
- RIGGS, M. et al. Bovine antibody against *Cryptosporidium parvum* elicits a circumsporozoite precipitate-like reaction and has immunotherapeutic effect against persistent cryptosporidiosis in SCID mice. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1927-1939, 1994.
- FAYER, R. et al. Immunogold labeling of stages of *Cryptosporidium parvum* recognized by immunoglobulins in hyperimmune bovine colostrum. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 487-490, 1991a.
- FAYER, R. et al. Production and preparation of hyperimmune bovine colostrum from passive immunotherapy of cryptosporidiosis. **Journal of Protozoology**, v. 38, n. 6, p. 38S-39S, 1991b.
- ABREU, V. J. S. **Avaliação da eficácia do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum***, 2001. 111 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- TILLEY, M.; UPTON, S. Sporozoites and merozoites of *Cryptosporidium parvum* share a common epitope recognized by a monoclonal antibody and two-dimensional electrophoresis. **Journal of Protozoology**, v. 38, n. 6, p. 48S-49S, 1991.
- UNGAR, B. ET AL. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 961-969, 1990.
- MEAD, J. et al. Cryptosporidial infections in SCID mice reconstituted with human or murine lymphocytes. **Journal of Protozoology**, v. 38, n. 6,

- p. 59S-61S, 1991.
18. COBEA Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**, 2. ed. [s.l.]: COBEA, 1996. 259 p.
 19. HILL, B.; DAWSON, A.; BLEWETT, D. Neutralisation of *Cryptosporidium parvum* sporozoites by immunoglobulin and non-immunoglobulin components in serum. **Research in Veterinary Science**, v. 54, n. 3, p. 356-360, 1993.
 20. WATZL, B. et al. Enhancement of resistance to *Cryptosporidium parvum* by pooled bovine colostrum during murine retroviral infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 4, p. 519-523, 1993.
 21. ARROWOOD, M.; MEAD, J.; MAHRT, J.; STERLING, C. Effects of immune colostrum and orally administered antisporozoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2283-2288, 1989.
 22. TAGHI-KILANI, R.; SEKLA, L.; HAYGLASS, K. The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. infection – studies with B cell-depleted mice. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 5, p. 1571-1576, 1990.
 23. BOHER, Y. et al. Enumeration of selected leukocytes in the small intestine of BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 2, p. 145-151, 1994.
 24. RASMUSSEN, K.; HEALEY, M. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p. 1648-1652, 1992.
 25. BONNIN, A.; DUBREMETZ, J.; CAMERLYNCK, P. Characterization and immunolocalization of an oocyst wall antigen of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa). **Parasitology**, v. 103, n. 2, p. 171-177, 1991.
 26. LUMB, R. et al. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. **Parasitology Research**, v. 74, n. 6, p. 531-536, 1988.
 27. MCDONALD, V.; MCCROSSAN, M.; PETRY, F. Localization of parasite antigens in *Cryptosporidium parvum*-infected epithelial cells using monoclonal antibodies. **Parasitology**, v. 110, n. 3, p. 259-268, 1995.
 28. CURRENT, W.; REESE, N. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. **Journal of Protozoology**, v. 33, n. 1, p. 98-108, 1986.
 29. SAXON, A.; WEINSTEIN, W. Oral administration of bovine colostrum anti-cryptosporidia antibody fails to alter the course of human cryptosporidiosis. **Journal of Parasitology**, v. 73, n. 2, p. 413-415, 1987.
 30. BJORNEBY, J.; RIGGS, M.; PERRYMAN, L. *Cryptosporidium parvum* merozoites share neutralization-sensitive epitopes with sporozoites. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 1, p. 298-304, 1990.
 31. LUFT, B. et al. Characterization of the *Cryptosporidium* antigens from sporulated oocysts of *Cryptosporidium parvum*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 10, p. 2436-2441, 1987.
 32. RIGGS, M. et al. Neutralization-sensitive epitopes are exposed on the surface of infectious *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Journal of Immunology**, v. 143, n. 4, p. 1340-1345, 1989.
 33. TILLEY, M. et al. *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) oocyst and sporozoite antigens recognized by bovine colostrum antibodies. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, p. 2966-2971, 1990.
 34. UHL, E. et al. Neutralization-sensitive epitopes are conserved among geographically diverse isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p. 1703-1706, 1992.
 35. NACIRI, M. et al. Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrum. **Veterinary Parasitology**, v. 53, n. 3-4, p. 173-90, 1994.