

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UTILIZAÇÃO DO MÉTODO PCR-LIS-SSCP NA ANÁLISE DO  
FRAGMENTO TGR1E DAS CEPAS *RH* E *P* DE *Toxoplasma gondii*.

Joyce Helena Torrezan Vinagre

Uberlândia - MG

Junho - 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UTILIZAÇÃO DO MÉTODO PCR-LIS-SSCP NA ANÁLISE DO  
FRAGMENTO TGR1E DAS CEPAS *RH* E *P* DE *Toxoplasma gondii*.

Joyce Helena Torrezan Vinagre

Monografia apresentada  
à coordenação do curso  
de Ciências Biológicas,  
da Universidade Federal  
de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Uberlândia - MG

Junho - 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UTILIZAÇÃO DO MÉTODO PCR-LIS-SSCP NA ANÁLISE DO  
FRAGMENTO TGR1E DAS CEPAS *RH* E *P* DE *Toxoplasma gondii*.

JOYCE HELENA TORREZAN VINAGRE

Prof. Dr. José Roberto Mineo

Monografia apresentada  
à coordenação do curso  
de Ciências Biológicas,  
da Universidade Federal  
de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Uberlândia - MG

Junho - 1998

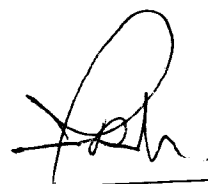
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UTILIZAÇÃO DO MÉTODO PCR-LIS-SSCP NA ANÁLISE DO  
FRAGMENTO TGR1E DAS CEPAS RH E P DE *Toxoplasma gondii*.

JOYCE HELENA TORREZAN VINAGRE

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 24/06/98

Nota 1,0

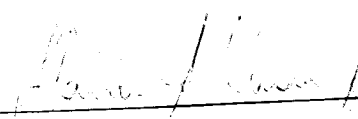


---

Orientador  
Prof.Dr. José Roberto Mineo

---

Co-orientador  
Prof.Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho



---

Co-orientadora  
Prof<sup>ª</sup> Ms. Flávia Andrade C. Borges

Uberlândia, 24 de Junho de 1998

"O GRAU DE CIVILIZAÇÃO DE UM POVO  
SE MEDE PELA FORMA COMO  
TRATA OS ANIMAIS".

HUMBOLDT

A DEUS PELA VIDA.  
A MINHA FAMÍLIA PELO INCENTIVO  
NAS MINHAS CONQUISTAS.  
AO MEU NAMORADO, LUIZ VITOR , PELO CARINHO  
E COMPANHEIRISMO SEMPRE PRESENTES.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AO PROFESSOR Dr. JOSÉ ROBERTO MINEO, PELA  
ORIENTAÇÃO NA MINHA INICIAÇÃO À  
PESQUISA CIENTÍFICA.

AO PROFESSOR Dr. LUIZ RICARDO E  
À PROFESSORA Ms. FLÁVIA ANDRADE  
PELO AUXÍLIO E DEDICAÇÃO  
NA EXECUÇÃO DESTES.

AOS AMIGOS DOS LABORATÓRIOS DE  
GENÉTICA MOLECULAR E IMUNOLOGIA  
PELO APOIO NA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO.



## ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Histórico.....	1
1.2-Taxonomia e Habitat.....	2
1.3-Ciclo biológico do parasita.....	2
1.4-Morfologia do parasita.....	4
1.5-Perfil da toxoplasmose.....	4
1.6-Diagnósticos da toxoplasmose.....	5
2-OBJETIVO.....	9
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1-Tipos de cepas.....	10
3.2-Obtenção do parasita.....	10
3.2.1-Taquizoítas (Cepa <i>RH</i> ).....	11
3.2.2-Bradizoítas (Cepa <i>P</i> ).....	11
3.3-Protocolo de extração de DNA.....	12
3.3.1-Taquizoítas (Cepa <i>RH</i> ).....	12
3.3.2-Bradizoítas (Cepa <i>P</i> ).....	12
3.4-Reação de amplificação pelo método PCR.....	13
3.5-Método de detecção de mutações LIS-SSCP.....	14
3.5.1-Coloração pela prata.....	15
4-RESULTADOS.....	16
4.1-Amplificação por PCR.....	16
4.2-Método LIS-SSCP.....	16
5-DISCUSSÃO.....	20
6-CONCLUSÃO.....	23
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

## RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório que acomete vários animais inclusive o homem. *T. gondii* tem emergido como um dos patógenos mais oportunistas em pacientes imunocomprometidos e, portanto, a detecção precoce da infecção é de suma importância para que se de o início do tratamento. Para o diagnóstico da infecção utilizou-se neste trabalho o método PCR, no qual foram utilizados os primers T1 e T2. Duas formas evolutivas do parasita foram analisadas: taquizoítas provenientes da cepa *RH* - de maior virulência e bradizoítas provenientes da cepa *P* - de maior tendência ao encistamento. Para tal, utilizou-se o método LIS-SSCP na análise do segmento TGR1E. Pela análise dos fragmentos amplificados verificou-se ausência de polimorfismo entre as duas cepas de *Toxoplasma gondii* indicando portanto, que o grau de virulência e encistamento não é codificado no segmento TGR1E.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; PCR; LIS-SSCP

## **1-INTRODUÇÃO**

### **1.1-HISTÓRICO**

*Toxoplasma gondii* foi descoberto em 1908 por Charles Nicolle e Louis Manceaux na espécie *Ctenodactylus gondii* (Pallas 1778)-um roedor do norte da África, quando ambos estudavam no Instituto Pasteur de Túnis a epidemiologia da leishmaniose (MOULIN, 1993). *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, semelhante aos coccídios e aos plasmódios REY (1991), que infecta uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo os seres humanos ( WERK, 1985; Mc LEOD *et al.*, 1991; JOINER and DUBREMETZ, 1993; SIBLEY, 1993; SMITH, 1995, GRIMWOOD *et al.*, 1996).

## 1.2-TAXONOMIA E HABITAT

Sua classificação entre os seres vivos, segundo Levine (1980),

**Reino Protista**

**SubReino Protozoa**

**Filo Apicomplexa**

**Classe Sporozoea**

**SubClasse Coccidia**

**Ordem Eucoccidia**

**SubOrdem Eimeriina**

**Família Sarcocystidae**

**Gênero *Toxoplasma***

**Espécie *Toxoplasma gondii***

(NEVES *et al.*, 1995).

O gênero *Toxoplasma* caracteriza-se por apresentar no seu ciclo vital uma fase extraintestinal, com reprodução assexuada em mamíferos e aves; e outra enteroepitelial, com reprodução sexuada nos gêneros *Felis* e *Lynx* (DUBLEY and FRENKEL, 1972; BONHOMME *et al.*, 1992; PÊSSOA, 1992; NETO *et al.*, 1995).

## 1.3-CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA

Dentro de seu complexo vital, *Toxoplasma gondii* apresenta três formas principais de desenvolvimento: taquizoítas, bradizoítas e oocistos/esporozoítas, que possuem diferentes graus de resistência ao meio, e por isso cada estágio tem sua importância relativa na transmissão da doença (LARSSON, 1989; WONG and REMINGTON, 1993).

Os taquizoítas são as formas de multiplicação rápida, próprias da infecção toxoplásmica aguda (KASPER and GATEL-BUZONI, 1998). A multiplicação se dá por um processo de brotamento interno de dois organismos, chamado endodiogenia, dentro de vacúolos intracitoplasmáticos (FRENKEL, 1995). Apresentam-se como formas livres ou agrupadas no interior dos tecidos sendo pouco resistentes ao meio ambiente e não resistem aos processos digestivos (RAMÍREZ *et al.*, 1995). Têm importância epidemiológica, pois são as formas transmitidas via transplacentária, estabelecendo desta forma a toxoplasmose congênita (LARSSON, 1989).

Os bradizoítas são organismos de multiplicação lenta nos cistos teciduais e se desenvolvem durante a infecção crônica, principalmente no cérebro, retina VINHAL *et al.* (1994), BENCHIMOL and MOREIRA (1995), músculo esquelético e cardíaco. O vacúolo citoplasmático que envolve os bradizoítas transforma-se na cápsula do cisto, oferecendo resistência ao parasita à ação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro e à ação da pepsina (Mc LEOD *et al.*, 1991). Os cistos podem persistir por toda a vida do hospedeiro, constituindo uma forma de latência do parasita (AMBROISE-THOMAS and PELLOUX, 1993). Os bradizoítas infectam os animais, incluindo o homem, pela manipulação ou ingestão de carne crua ou mal passada (LARSSON, 1989; FRENKEL, 1995; RAMÍREZ *et al.*, 1995).

Os esporozoítas desenvolvem-se nos esporocistos, no interior dos oocistos; os oocistos imaturos são as formas eliminadas juntamente com as fezes dos hospedeiros definitivos (RAMÍREZ *et al.*, 1995). Eles contêm no seu interior, após a esporulação no ambiente externo, quatro esporozoítas contidos em dois esporocistos. São extremamente resistentes, principalmente em regiões de clima quente e úmido, podendo permanecer viáveis por até 18 semanas após a eliminação. Este estágio pode infectar outros animais e o homem através do contato direto com as fezes do felino, por manipulação e ingestão, ou indireto,

por vetores mecânicos e alimentos contaminados (LARSSON,1989; RAMÍREZ *et al.*, 1995).

#### 1.4-MORFOLOGIA DO PARASITA

Os protozoários medem de 4 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largura; apresentam núcleo no centro do corpo ou próximo à extremidade posterior, uma membrana externa simples e uma membrana interna dupla que é fenestrada e incompleta (REY, 1991).

Os cistos que se formam na fase crônica da infecção medem entre 20 a 200  $\mu\text{m}$ , podendo ser alongados ou achatados dependendo do tecido onde se encontram (REY, 1991).

Sendo assim, o conhecimento morfológico e fisiológico de *Toxoplasma gondii* nos diferentes estágios de infecção é de suma importância não apenas no estudo da toxoplasmose, mas também na avaliação dos aspectos imunes do hospedeiro.

#### 1.5-PERFIL DA TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii* que pode acometer os animais por via congênita ou adquirida. Na infecção congênita, *Toxoplasma* atravessa a placenta e invade os tecidos do feto em desenvolvimento. As conseqüências da infecção dependem do tempo de gestação, sendo mais grave aquela adquirida durante os primeiros estágios de gravidez (ROTHOVA, 1993).

A infecção adquirida pode ocorrer em todas as fases do desenvolvimento do animal (hospedeiro); geralmente a infecção é assintomática sendo a

toxoplasmose aguda e infecção em indivíduos imunocomprometidos as mais sérias formas da doença (HALL, 1992).

Na fase crônica, os parasitas permanecem encistados e viáveis durante toda a vida do hospedeiro sem afetar a saúde dos imunocompetentes. Em caso de imunodepressão, os cistos podem se reativar e induzir sérios problemas e também podem induzir reativação de infecção latente com liberação de taquizoítas dos cistos, causando uma infecção disseminada (HALL, 1992).

Há estimativas de que 15% a 85% da população humana esteja infectada pelo *Toxoplasma gondii* e este organismo tem emergido como sendo o patógeno mais oportunista em pacientes imunocomprometidos, seja por câncer ISRAELSKI and REMINGTON (1993), RAMZI and KENNETH (1996), transplantes LUFT and REMINGTON (1988), ou AIDS (LUFT and REMINGTON, 1992; DALSTON *et al.*, 1994; NEW and HOLLIMAN, 1994; HINRICHSEN *et al.*, 1996; KASPER and GATEL-BUZONI, 1998).

Desta forma, *Toxoplasma gondii* tem sido muito investigado em todo o mundo, por vários pesquisadores, pois a incidência da reativação da infecção em pacientes aidéticos está entre 5% a 33% (KASPER and BOOTHROYD, 1993).

Sendo assim, o diagnóstico da toxoplasmose deve ser o mais precoce e o mais confiável possível, para que o tratamento da doença tenha maiores chances de obter resultados satisfatórios.

## **1.6-DIAGNÓSTICOS DA TOXOPLASMOSE**

Vários testes foram desenvolvidos, e normalmente o diagnóstico de rotina baseia-se na detecção de anticorpos específicos para o parasita (FLECK, 1989). Dentre estes métodos, o teste do corante de Sabin-Feldman ou "Dye Test" tem sido muito empregado nos últimos 40 anos no diagnóstico da toxoplasmose e ainda é utilizado como teste de referência pela OMS (Organização Mundial de

Saúde). Apesar de possuir alta especificidade e sensibilidade contudo, este teste não é usado em rotina laboratorial por necessitar da manipulação de organismos vivos e de sua manutenção para que os mesmos estejam viáveis (FLECK, 1989).

Portanto, o método sorológico mais utilizado atualmente é o ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assays") que tem a vantagem de poder ser empregado em várias modalidades, permitindo análises não apenas qualitativas mas também quantitativas (VERHOFSTED and RENTERGHEM, 1989; CAMARGO *et al.*, 1991; TAKAHASHI and ROSSI, 1994). Uma das modificações do ELISA clássico (tradicional) é o Dot-ELISA, no qual as placas de poliestireno são trocadas por papéis de nitrocelulose, permitindo assim, um teste semi-quantitativo na determinação do título da amostra a ser analisada (ELSAID *et al.*, 1995).

Técnicas de Imunoblot utilizando anticorpos IgA (imunoglobulina A) e IgM (imunoglobulina M) também têm sido consideradas úteis como teste sorológico adicional para o diagnóstico de rotina, principalmente nos portadores da AIDS (GROSS *et al.*, 1992). Estudos através de cortes histológicos e culturas do parasita são de difícil execução e consomem muito tempo na determinação do diagnóstico.

Os testes sorológicos, mesmo sendo muito utilizados apresentam alguns problemas, pois: a reativação nem sempre é acompanhada por mudanças nos níveis de anticorpos, a presença de IgM não é necessariamente indicativa de infecção recente, e a detecção das imunoglobulinas IgG e IgM pode ser dificultada em recém-nascidos congenitamente infectados e em pacientes severamente imunocomprometidos (HOLLIMAN, 1994). Algumas destas dificuldades ocorrem devido aos resultados falso-positivos e falso-negativos que acometem particularmente estes pacientes cuja produção de anticorpos, demonstráveis pelo organismo do hospedeiro, pode estar comprometida (ARAUJO and REMINGTON, 1980).



Técnicas de Biologia Molecular como o "Southern Blotting" e PCR ("polymerase chain reaction") também têm sido desenvolvidas com o intuito de possibilitar resultados mais específicos e de maior rapidez em pacientes imunocomprometidos (LAVRARD *et al.*, 1995).

O "Southern Blotting" é uma das mais valiosas técnicas para a identificação de genes clonados; foi descoberta por E. M. Southern e explora as propriedades do gel de eletroforese e do filtro de nitrocelulose. Resumidamente, este método consiste no isolamento do DNA, clivagem do mesmo com enzimas de restrição e posterior separação dos fragmentos por eletroforese; estes fragmentos são então transferidos para um papel de nitrocelulose que é então encubado com sonda marcada radioativamente e finalmente utiliza-se uma autoradiografia para localizar o DNA marcado (SUZUKI *et al.*, 1989).

O método PCR é uma ferramenta Molecular importante e pode ter uma aplicação similar ao "Southern blot" contudo, a maior vantagem do PCR é que ele é tão sensível, que uma única molécula de DNA pode ser amplificada (INNIS *et al.*, 1990; ERLICH *et al.*, 1991; REY, 1992; LEWIN, 1997). Esta técnica envolve interações cinéticas complexas entre o DNA alvo, o DNA produto, marcadores de oligonucleotídeos (polímeros compostos de 10 a 30 nucleotídeos), dNTPs (desoxinucleotídeo trifosfato), tampão e DNA polimerase, que se modificam durante o curso da reação (KEOHAVONG and THILLY, 1989; SAMBROOK *et al.*, 1989).

O PCR não possui um protocolo único de execução, sendo assim para cada nova situação há necessidade de se otimizar o processo; esta otimização consiste na variação de alguns dos componentes do PCR: concentração da *Taq* DNA polimerase, concentração de dNTPs (desoxinucleotídeo trifosfato), concentração de  $Mg^{2+}$  (íon magnésio), tampão Tris-HCl, duração e variação de temperatura para desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA (INNIS *et al.*, 1990).

Com relação à utilização do PCR no diagnóstico laboratorial aplicado a doenças causadas por agentes infecciosos, BURG *et al.* (1989) e SAVVA and HOLLIMAN. (1990) descreveram o uso do PCR na detecção de *Toxoplasma gondii*; WATERS and McCUTCHAN (1990) e SCHRIEFER *et al.* (1991) para a detecção de *Plasmodium falciparum* e SHIKANAI-YASUDA *et al.* (1996) para a detecção de *Trypanosoma cruzi*.

Após a amplificação por PCR o método LIS-SSCP ("Low Ionic Strength – Single-stranded Conformation Polymorphism") pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar na verificação de possíveis mutações do produto amplificado (MARUYA *et al.*, 1996; LEWIN, 1997).

O método SSCP, descoberto primeiramente por ORITA *et al.* (1989) baseia-se na mobilidade de uma única banda de ácido nucleico num gel não desnaturante de poliacrilamida em eletroforese, onde mutações nas sequências, pelos efeitos na migração de pequenos fragmentos de  $_{ss}$ DNA ("single-stranded DNA"), podem ser detectadas (FUJITA and KIYAMA, 1995; KIYAMA and FUJITA, 1996). A grande diferença entre o método SSCP e o método LIS-SSCP é que o segundo não utiliza formamida, mas sim sacarose e é corado pela prata e não por brometo de etídeo.

Depois do produto ter corrido num gel de poliacrilamida, é então empregada a coloração pela prata no reconhecimento e na revelação das bandas simples de DNA ( $_{ss}$ DNA ) (MARUYA *et al.*, 1996).

## **2-OBJETIVO**

O presente trabalho se propôs a analisar, pelo método PCR-LIS-SSCP, a seqüência TGR1E das cepas *RH* e *P* de *Toxoplasma gondii*.

### **3-MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1-TIPOS DE CEPAS**

Cepas *RH* e *P* de *Toxoplasma gondii* foram utilizadas e são mantidas no laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia desde 1982 e 1995 respectivamente. As do tipo *RH* foram obtidas de exudato peritoneal de camundongos Swiss inoculados com taquizoítas por via intraperitoneal por 72 horas. As do tipo *P* foram obtidas de cérebros de camundongos Swiss inoculados com bradizoítas por via oral com 60 dias de incubação. As cepas são diferenciadas pelo tempo que demoram para levar o camundongo à morte e pela tendência maior ou menor de encistamento; a cepa *RH* é a mais virulenta, enquanto que a cepa *P* tem maior prevalência no encistamento.

#### **3.2-OBTENÇÃO DE PARASITAS**

Para a extração da cepa *RH* foram utilizados 4 camundongos Swiss e para a cepa *P* foram utilizados 2 camundongos Swiss.

### **3.2.1-TAQUIZOÍTAS (Cepa *RH*)**

O exudato peritoneal foi centrifugado em baixa rotação (2000 rpm) por 5 minutos e o "pellet" desprezado. Foi adicionado 10 ml de tampão PBS (solução salina fosfatada) - 0.01 M, pH 7.2 e retornado à centrífuga refrigerada em alta rotação (13000 rpm) por 15 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" utilizado. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. Após as lavagens, as amostras foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e devidamente rotuladas e datadas.

### **3.2.2-BRADIZOÍTAS (Cepa *P*)**

Camundongos Swiss com 60 dias de incubação foram sacrificados e os cérebros retirados. Os cérebros foram primeiramente lavados por 3 vezes com tampão PBS e então macerados com pistilo; foram passados 3 vezes por uma seringa e após por uma agulha ( $n^{\circ}25\times 6$ ) também por 3 vezes. O líquido foi centrifugado por 3 vezes com PBS em alta rotação (13000 rpm) por 10 minutos, sendo desprezado somente o sobrenadante. Após as lavagens, o "pellet" foi ressuspenso em PBS resultando assim num volume total de 5 ml. Para a verificação da presença dos cistos, uma amostra do produto foi analisada ao microscópio óptico e utilizada imediatamente.

### **3.3-PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA**

#### **3.3.1-TAQUIZOÍTAS (Cepa *RH*)**

O exudato foi descongelado a temperatura ambiente, passado para um tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml e centrifugado com tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 0,1 mM) por 2 minutos a 8000 rpm por 2 vezes. Adicionou-se ao "pellet", 98 µl de tampão TE e 2 µl de proteinase K (Proteinase K (SIGMA); Tris 10 mM; EDTA 0.1 mM) e colocado em banho-maria a 50°C por 2 horas. Após, foi adicionado 30 µl de clorofórmio e centrifugado em alta rotação (13000 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um Eppendorf de 500µl e uma pequena amostra foi corrida num gel de agarose 0.8% para verificar a presença de DNA. Após a verificação, a amostra foi deixada a 95°C por 15 minutos para que a proteinase K fosse desativada.

#### **3.3.2-BRADIZOÍTAS (Cepa *P*)**

O material em solução foi transferido para um Eppendorf de 2ml, centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos e descartado o sobrenadante; 1 ml de material em solução foi adicionado, centrifugado e assim sucessivamente até que o volume do "pellet" fosse reduzido a 0.5 ml. Foi adicionado 800 µl de tampão de lise gelado, o Eppendorf agitado e incubado no gelo por 10 minutos; sendo, então, centrifugado a 8000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 500 µl do tampão de lise gelado (Tris-HCl 1 M, pH 7.5; Sacarose 1.28 M; MgCl<sub>2</sub> 1M; Triton X-100 20%; H<sub>2</sub>O "Milli Q") diluído 2×, sendo o "pellet" ressuspenso e incubado por 10 minutos no gelo. O material foi então centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado; a lavagem foi repetida por mais 3 vezes, 2 vezes para que o material

ficasse livre de hemoglobina e 1 vez com tampão TE. Adicionou-se 200 µl de tampão de extração (Tris-HCl 1M, pH 7.5; Guanidina 5M; H<sub>2</sub>O "Milli Q") e o "pellet" foi ressuspenso totalmente e incubado a 55°C por 2 horas em banho-maria. Foi adicionado 100 µl de tampão de precipitação (Tris-HCl 1M, pH 7.5; Acetato de amônia 1.225M; H<sub>2</sub>O "Milli Q"), o Eppendorf agitado suavemente e incubado por 30 minutos no gelo. Após, adicionou-se 300 µl de isopropanol, agitou-se suavemente o tubo e incubado no gelo por 10 minutos. Foi, então, centrifugado a 10000 rpm por 2 minutos para sedimentar o DNA; o sobrenadante foi descartado e o "pellet" centrifugado por 2 vezes em etanol 70% a 8000 rpm por 2 minutos. O "pellet" foi deixado para secar "overnight" com o tubo aberto sobre um papel de filtro. Foi então diluído em 800 µl de tampão de diluição Tris-borato EDTA (Tris-HCl 1M, pH 7.5; EDTA; H<sub>2</sub>O "Milli Q") ½ × e incubado em banho-maria por 4 horas para que o "pellet" fosse dissolvido. Uma amostra deste produto foi corrida em gel de agarose 0.8% para verificar a presença de DNA.

### 3.4-REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PELO MÉTODO PCR

Para a amplificação por PCR foram utilizados os primers (T1) e (T2) cujas seqüências são respectivamente 5'-TCCCTACGTGGTGCCGCATTGCCT (posição 28 a 55) e 5'-ATGGTCCGGCCGGTGTATGATATGCGAT (posição 218 a 194) da seqüência TGR1E - 191 bp (LAMORIL *et al.*, 1996). A mistura para a amplificação foi feita com 1 µl de cada primer em 30 µl de solução contendo 0.8 unidades de *Taq* DNA polimerase (1u/µl), 0,6 µl de dNTPs 100 mM (10 µl de A + 10 µl de T + 10 µl de C + 10 µl de G + 60 µl de H<sub>2</sub>O "Milli Q") e 3 µl de tampão da *Taq* concentração 10× (KCl<sub>2</sub> 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), perfazendo um total de 6,4 µl para cada reação e 38,4 µl no total de 6 reações. Foram

utilizadas 6 amostras numeradas de 1 a 6: amostras de números 1 e 2 de taquizoítas (cepa *RH*), amostras de números 3 e 4 de bradizoítas (cepa *P*) e amostras de números 5 e 6 corresponderam ao controle negativo que continha DNA humano; a variação deu-se apenas na concentração molar de  $MgCl_2$ .

Para as amostras de número 1, 3 e 5 a concentração de  $MgCl_2$  foi de 1.5 mM e para as amostras de números 2, 4 e 6 a concentração de  $MgCl_2$  foi de 2.5 mM; a quantidade de DNA utilizada foi de 50  $\eta g/\mu l$  isto é: 2  $\mu l$  de cada amostra de *Toxoplasma gondii* (1, 2, 3 e 4) e 8  $\mu l$  de cada amostra de DNA humano (5 e 6); e a quantidade de  $H_2O$  foi de 21,6  $\mu l$  para as amostras 1 e 3; 18,6  $\mu l$  para as amostras 2 e 4 e para as amostras de número 5 e 6 foram 15,6  $\mu l$  e 12,6  $\mu l$  respectivamente.

As reações foram realizadas em um "Mini Cycler PTC 150™" (MJ Research, INC.) de acordo com o protocolo modificado de LAMORIL *et al.* (1996) nas seguintes condições: cinco minutos a 95°C, seguido de 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; com a temperatura mantida constante a 72°C por mais 30 segundos e finalizando-o com uma temperatura de 4°C.

Os produtos do PCR correram por 50 minutos em um gel de agarose 2% (temperatura ambiente) a 100V - corrente variável e foram visualizados por coloração com brometo de etídeo. Foram escolhidas duas amostras - uma amostra de cada cepa - com melhor definição para a realização do método LIS-SSCP.

### **3.5-MÉTODO DE DETECÇÃO DE MUTAÇÕES - LIS-SSCP**

Foram adicionados 1,5 e 2,0  $\mu l$  de cada amostra de produto amplificado em 18,5 e 18  $\mu l$ , respectivamente de solução de LIS (Sacarose 10%; Azul de



bromofenol 0,01%; Xilenocianol 0,01%), resultando portanto num volume final de 20  $\mu\text{l}$ ; esta mistura foi encubada por 5 minutos a 97°C em um "Programmable Thermal Controller PTC 100™" (MJ Research, INC). Para a caracterização do perfil eletroforético foram aplicados 8  $\mu\text{l}$  desta mistura em um gel de Poliacrilamida 12% (Acrilamida 30% - Acrilamida 14,21 g, Bisacrilamida 0,79 g, H<sub>2</sub>O 50 ml - Persulfato 10%; TEMED; TBE; H<sub>2</sub>O "Milli Q"). O gel foi colocado entre duas placas de vidro com espaçadores de 0.5 mm; posteriormente à aplicação deste, foi colocado um pente para a formação dos poços de aplicação das amostras, após a polimerização o gel foi condicionado em uma cuba vertical; as amostras foram aplicadas e a corrida por 2 horas deu-se a 15 mA-voltagem oscilante. O tampão utilizado foi o TBE (Tris 0,44M; Ác. Bórico 0,44M; EDTA 10mM; H<sub>2</sub>O "Milli Q") 1× e após a corrida, o método de coloração pela prata foi empregado.

### **3.5.1-COLORAÇÃO PELA PRATA**

O gel foi fixado em solução de Ácido Acético 10% por 10 minutos; lavado com H<sub>2</sub>O "Milli Q" duas vezes por 2 minutos cada vez; emergido em solução de Nitrato de Prata 0.012 M (200 mg/100 ml H<sub>2</sub>O) e Formalina 0.056 M (150  $\mu\text{l}$  de formaldeído/100 ml de H<sub>2</sub>O) por 20 minutos; lavado duas vezes por 30 segundos cada vez com H<sub>2</sub>O "Milli Q"; revelado com solução gelada ( 8°C ) de Carbonato de Sódio 0,28 M (3 g/100 ml H<sub>2</sub>O), Formalina 0,056 M e 20  $\mu\text{l}$  de Tioissulfato 4  $\mu\text{M}$  (10 mg/100 ml H<sub>2</sub>O) até o aparecimento das bandas e a reação foi interrompida com solução de Ácido Acético 10% por 5 minutos.

## **4-RESULTADOS**

### **4.1-AMPLIFICAÇÃO POR PCR**

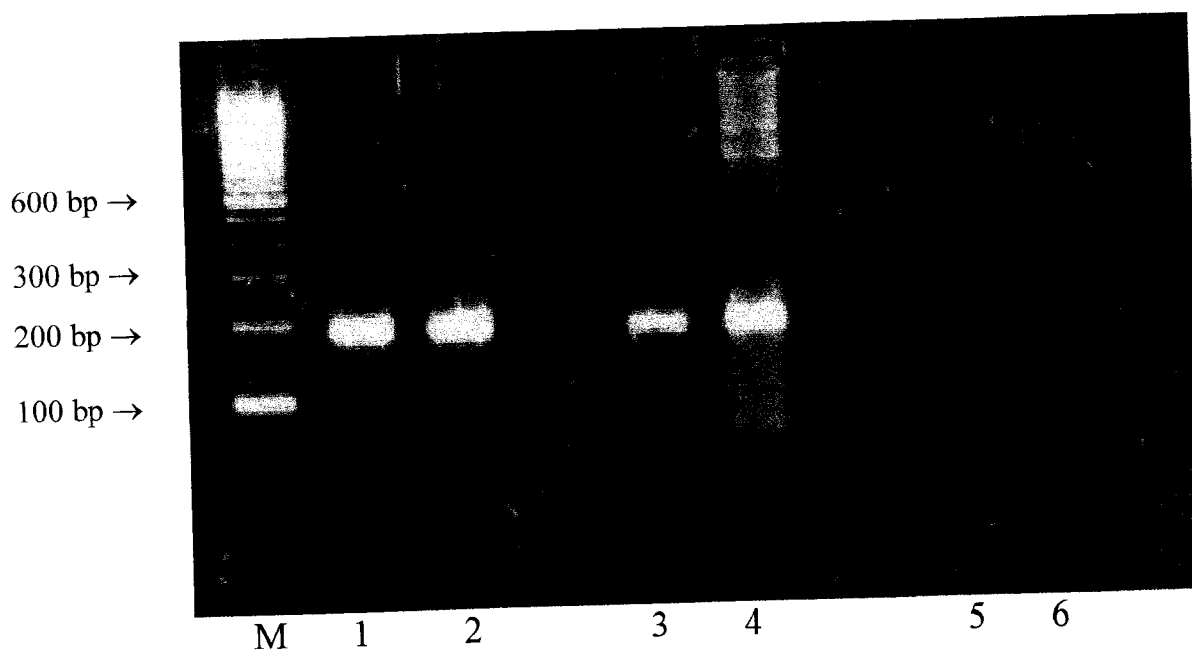
A Figura 1 apresenta os resultados da amplificação por PCR num gel de agarose 2% onde a variação de  $MgCl_2$  foi analisada; um marcador de tamanho de DNA foi utilizado para verificar o tamanho do fragmento e demonstrou que o mesmo corresponde a 191 bp.

A visualização das amostras de número 1 (cepa *RH* de taquizoítas), número 3 (cepa *P* de bradizoítas) e número 5 (controle negativo - DNA humano) apresentaram melhor definição com a concentração de 1,5 mM de  $MgCl_2$ .

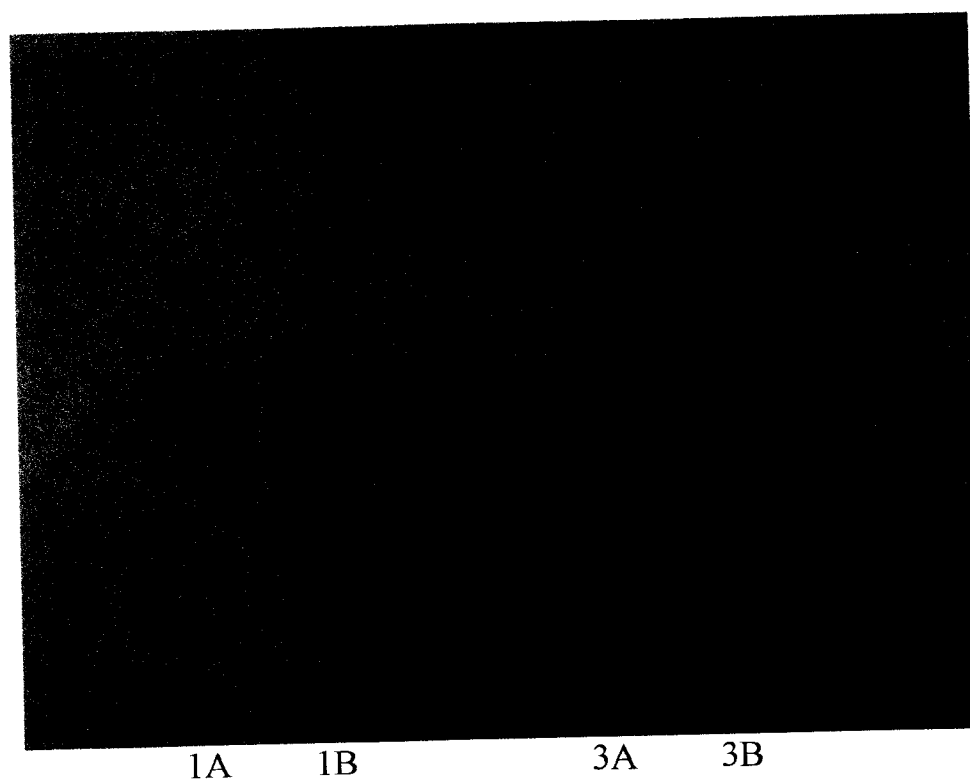
### **4.2-MÉTODO LIS-SSCP**

A Figura 2, um gel de poliacrilamida 12%, demonstra que a eficiência do método foi maior quando utilizado 1,5  $\mu$ l de material amplificado para 18,5  $\mu$ l de solução LIS - amostras 1A e 3A - taquizoítas (cepa *RH*) e bradizoítas (cepa *P*) respectivamente; o DNA humano, utilizado como controle negativo no experimento anterior, não foi utilizado neste procedimento, pois a função deste

método é comparar somente as cepas *RH* e *P* do *Toxoplasma gondii*. O gel demonstrou também que as cepas *RH* e *P* não possuem polimorfismo no segmento analisado - TGR1E.



**Figura 1.** Amostras de diferentes cepas (*RH* e *P*) de *Toxoplasma gondii* em um gel de agarose 2% para visualizar a amplificação por PCR. M - marcador de tamanho (bp); amostras 1 e 2 - taquizoítas (cepa *RH*), 3 e 4 bradizoítas (cepa *P*), 5 e 6 - controle negativo (DNA humano). Amostras 1, 3 e 5 - 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; amostras 2, 4 e 6 - 2,5 mM de  $MgCl_2$ .



**Figura 2.** Amostras das cepas *RH* e *P* de *T. gondii* em um gel de poliacrilamida 12% para verificar a migração de fitas simples de DNA ( $ssDNA$ ). Amostras 1A e 3A - 1,5  $\mu$ l de produto amplificado + 18,5  $\mu$ l de solução de LIS; amostras 1B e 3B - 2,0  $\mu$ l de produto amplificado + 18  $\mu$ l de solução de LIS. Amostras 1 (cepa *RH*), amostras 3 (cepa *P*) de *T. gondii*.

## 5-DISCUSSÃO

O genoma do hospedeiro é de extrema importância na determinação da susceptibilidade e na severidade da infecção pelo *Toxoplasma gondii* segundo McLEOD *et al.* (1989); entretanto, estudos comprovam que além das características genéticas do hospedeiro, o genótipo do parasita também pode influenciar na severidade da doença ( SIBLEY and BOOTHROYD, 1992; SUZUKI and JOH, 1994; HOWE and SIBLEY, 1995; HOWE *et al.*, 1996).

Contudo, a patogenicidade de *T. gondii* também pode ser influenciada pelas diferentes vias de inoculação e pelo estágio do ciclo de vida do parasita (SUZUKI *et al.*, 1993).

Desta forma, um estudo mais aprimorado deve ser realizado enfocando não apenas o ciclo vital e as vias de transmissão, mas também a caracterização e a virulência das diferentes cepas de *T. gondii*. O diagnóstico é de extrema importância na detecção precoce e no início do tratamento, e o estudo da virulência por estar relacionado a uma patogenicidade mais "branda" ou mais "acentuada" (HOWE *et al.*, 1996).

Com relação ao diagnóstico, o PCR tem se mostrado um método relativamente eficaz na caracterização de diferentes estágios e formas de toxoplasmose (CAZENAVE *et al.*, 1990; CASENAVE *et al.*, 1991; JAMES *et al.*, 1996; LAMORIL *et al.*, 1996).

O potencial do método PCR baseia-se no fato de que produtos de um ciclo de replicação servem como reagentes para a próxima etapa, isto é cada ciclo sucessivo essencialmente dobra a quantidade de DNA sintetizado no ciclo anterior, o que resulta numa acumulação exponencial para o DNA reagente específico em aproximadamente  $2^n$ , onde  $n$  é o número de ciclos (INNIS *et al.*, 1990).

Neste estudo, a especificidade do método PCR ficou comprovada na amplificação - identificação de *Toxoplasma gondii* para ambas as cepas-RH e P (como mostrado na Fig. 1) e a concentração de 1,5 mM de  $MgCl_2$  se mostrou mais eficaz, pois não houve o aparecimento de bandas inespecíficas como encontrado com a concentração de 2,5 mM (Figura 1).

O aparecimento destas bandas inespecíficas pode ter sido ocasionado pela forte influência que o íon magnésio tem em muitos passos do PCR, como por exemplo: anelamento dos "primers", temperatura de dissociação do DNA reagente e produto do PCR, especificidade do produto, formação dos "primer-dimer" e fidelidade na atividade enzimática.

O excesso de  $Mg^{2+}$  estimula a produção de produtos não específicos enquanto que quantidades insuficientes deste mesmo íon reduzem o rendimento.

A *taq* DNA polimerase, enzima fundamental neste processo, necessita de  $Mg^{2+}$  livre não apenas na ligação com o DNA alvo, mas também na ligação com os "primers" e com o dNTPs; por conseguinte, os protocolos para o PCR devem conter de 0.5 a 2.5 mM de  $Mg^{2+}$  sobre o total da concentração de dNTP. Contudo, a presença de EDTA no estoque dos "primers" ou mesmo no DNA reagente, também pode interferir na otimização da concentração de  $Mg^{2+}$  (INNIS *et al.*, 1990).

Com relação à análise de polimorfismo, métodos de isoenzima e RFLP ("Restriction fragment length polymorphism") têm sido utilizados na distinção de linhagens clonais de *Toxoplasma gondii* com o objetivo de caracterizar se as

cepas analisadas são ou não geneticamente similares (DARDÉ *et al.*, 1992; CRISTINA *et al.*, 1995).

Apesar de a alta virulência nas cepas de *Toxoplasma gondii* compreender menos que 10% das cepas encontradas na natureza, estas atingem uma porção substancial de pacientes com AIDS e toxoplasmose congênita (19 e 27% respectivamente) (HOWE and SIBLEY, 1995; HOWE *et al.*, 1996).

Assim sendo, identificação de fatores genéticos envolvidos com a virulência das cepas pode fornecer a compreensão sobre a patologia associada não somente com a toxoplasmose aguda, mas também com a forma crônica da doença.

A combinação da Genética Clássica e Molecular possibilita análises mais aprofundadas sobre a caracterização das diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*; atualmente, o método LIS-SSCP é o mais utilizado na detecção de mutações.

O técnica LIS-SSCP é uma versão aperfeiçoada do SSCP; o primeiro proporciona vantagens como: maior nitidez na visualização das bandas, maior estabilidade na formação do  $ssDNA$ , coloração pela prata ao invés de brometo de etídeo, maior praticidade na detecção laboratorial de mutações e aberrações genéticas em diferentes áreas, dentre outras (MARUYA *et al.*, 1996).

Neste estudo, o procedimento LIS-SSCP foi utilizado na análise do fragmento TGR1E de *Toxoplasma gondii*. A Figura 2 mostrou equivalência entre as cepas *RH* e *P* para o fragmento analisado (TGR1E).

O perfil das bandas (Fig.2) caracterizou ausência de polimorfismo no fragmento TGR1E de ambas as cepas, demonstrando que o gene que caracteriza uma virulência maior ou menor provavelmente não está localizado neste fragmento, pois este se mostrou com a mesma mobilidade eletroforética nas cepas analisadas.



## 6-CONCLUSÃO

Pelas análises obtidas com o método PCR, verificou-se que a utilização dos primers T1 - T2 e  $MgCl_2$  na concentração de 1,5 mM, evidenciaram uma boa amplificação para taquizoítas (cepa *RH*) e bradizoítas (cepa *P*) de *Toxoplasma gondii*, considerando-os como condições otimizadas no laboratório.

O método LIS-SSCP mostrou-se capaz de caracterizar a ausência de polimorfismo no fragmento TGR1E de taquizoítas (cepa *RH*) e bradizoítas (cepa *P*) de *Toxoplasma gondii*.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROISE - THOMAS, P. and PELLOUX, H. Toxoplasmosis - congenital and immunocompromised patients: a parallel. **Parasitology Today**, v. **9** (2), p. 61 - 63, 1993.
- ARAÚJO, F. G. and REMINGTON, J. S. Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. **Journal of Infection Diseases**, v. **141** (2), p. 144 - 150, 1980.
- BENCHIMOL, E. and MOREIRA, R. B. Toxoplasmosse ocular. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v. **155** (4), p. 226 - 228, 1995.
- BONHOMME, A. *et al.* *Toxoplasma gondii* cellular invasion. **Parassitologia**, v. **34**, p. 31 - 43, 1992.
- BURG, J. L. *et al.* Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. **27**, p. 1787 - 1792, 1989.

- CAMARGO, M. E. *et al.* Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 213 - 218, 1991.
- CASENAVE, J. *et al.* Detection de Toxoplasmes par amplification d'ADN. **Revue Française Laboratoires**, v. 209, p. 118 - 126, 1990.
- CASENAVE, J. *et al.* Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 44, p. 1037, 1991.
- CRISTINA, N. *et al.* A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. **Parasitology Research**, v. 81, p. 32 - 37, 1995.
- DALSTON, M. O. *et al.* Neurological manifestation of acquired immunodeficiency syndrome: histopathological correlation of 30 cases. **Revista brasileira de Neurologia**, v. 30 (4), p.103 - 109, 1994.
- DARDÉ M. L. *et al.* Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, p. 786 - 794, 1992.
- DUBLEY, J. P. and FRENKEL, J. F. Cystinduced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, p. 155 - 177, 1972.

- ELSAID, M. M. A. *et al.* Diagnosis of human toxoplasmosis by a Dot enzyme-linked immunosorbent assay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. **37 (2)**, p. 117 - 122, 1995.
- ERLICH, H. A. *et al.* Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. **252**, p. 479 - 506, 1991.
- FLECK, D. G. Annotation: diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. **42**, p. 191 - 193, 1989.
- FRENKEL, J. K. In: VERONESI, R. *et al.* **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 734 - 739.
- FUJITA, T. and KIYAMA, M. Identification of DNA polymorphism by asymmetric - PCR SSCP. **Bio Techniques**, v. **19 (4)**, p. 532 - 534, 1995.
- GRIMWOOD, J. *et al.* Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. **Infection and Immunity**, v. **64**, p. 4099 - 4104, 1996.
- GROSS, V. *et al.* Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. **Journal of Clinical Microbiology**, v. **30 (6)**, p. 1436 - 1441, 1992.
- HALL, S. M. Congenital toxoplasmosis. **British Medical Journal**, v. **305**, p. 291 - 306, 1992.

- HINRICHSEN, S. L. *et al.* Cerebrospinal fluid in 50 AIDS patients. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. **54** (2), p. 227 - 231, 1996.
- HOLLIMAN, R. E. Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. **Serodiagnosis in Immunotherapy Infection**, v. **6**, p. 5 - 16, 1994.
- HOWE, D. K. and SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infection Disease**, v. **172**, p. 1561 - 1566, 1995.
- HOWE, D. K. *et al.* Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. **64**, p. 5193 - 5198, 1996.
- INNIS, M. A. *et al.* **PCR - Protocols - A guide to methods and applications**. 1. ed. USA: Academic Press, 1990. 482p.
- ISRAELSKI, D. M. and REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clinical Infection Disease**, v. **17**, p. 5423 - 5435, 1993.
- JAMES, G. S. *et al.* Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: Effects of storage conditions on sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. **34** (6), p. 1572 - 1575, 1996.
- JOINER, K. A. and DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. **Infection and Immunity**, v. **61** (4), p. 1169 - 1172, 1993.

- KASPER, L. H. and BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: WARREN, K. S. **Blackwell Scientific Publicat.** 3. ed. Boston: [s.n], 1993. 610p.
- KASPER, L. H. and GATEL-BUZONI, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v. **14**, p. 150 - 156, 1998.
- KEOHAVONG, P. and THILLY, W. G. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, V. **86**, p. 9253 - 9257, 1989.
- KIYAMA, M. and FUJITA, T. High - throughput asymmetric - PCR SSCP analysis using well-controlled temperature conditions. **Bio Techniques**, v. **21 (4)**, p. 710 - 716, 1996.
- LAMORIL, J. *et al.* Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. **Journal of Clinical Pathology**, v. **49**, p. 89 - 92, 1996.
- LARSSON, C. E. Diagn ótico laboratorial da toxoplasmose - rea ções utilizadas e interpreta ção cl ínica. **Cães e Gatos**, v. **24**, p. 5 - 11, 1989.
- LAVRARD, I. *et al.* Pulmonary toxoplasmosis in HIV - infected patients: usefulness of polymerase chain reaction and cell culture. **European Respiratory Journal**, v. **8 (5)**, p. 697 - 700, 1995.

LEWIN, B. **Genes VI**. 6. ed. New York: Oxford University Press, 1997. 1260p.

LUFT, B. J. and REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis. **Journal of Infection Disease**, v. **157**, p. 1 - 6, 1988.

LUFT, B. J. and REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infection Disease**, v.**15**, p. 211 - 222, 1992.

MARUYA, E. *et al.* PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-Stranded Conformation Polymorphism) - a simple method for high - resolution allele typing of HLA -DRB1, - DQB1, and - DPB1. **Genome Research**, v. **6**, p. 51 - 57, 1996.

McLEOD, R. *et al.* Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of AXB/BXA recombinant inbred and congenic mice. **Journal of Immunology**, v. **143**, p. 3031 - 3034, 1989.

McLEOD, R. *et al.* *Toxoplasma gondii* - new advances in cellular and molecular biology. **Experimental Parasitology**, v. **72**, p. 109 - 121, 1991.

MOULIN, A. M. Historical introduction: the Institut Pasteur's contribution. 48<sup>th</sup> Forum in immunology. **Immunology**, v.**144**, p. 8 - 13, 1993.

NETO, V. A. *et al.* **Toxoplasmose**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 154p.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. 524p.

- NEW, L. C. and HOLLIMAN, R. E. Toxoplasmosis and human immunodeficiency virus (HIV) disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, p. 1079 - 1082, 1994.
- ORITA, M. *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 86, p. 2766 - 2770, 1989.
- PÊSSOA, S. B. Sporozoa - Família Sarcocystidae Gêneros *Toxoplasma* e *Sarcocystis*. In: PÊSSOA, S. B., MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 252 - 274.
- RAMÍREZ, M. L. G. *et al.* Incidence of anti-*Toxoplasma* antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28 (4), p. 333 - 337, 1995.
- RAMZI, D. and KENNETH, L. Toxoplasmosis in the patient with cancer. **Infection Medicine**, v. 13 (2), p. 998 - 1051, 1996.
- REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1991. 731p. Cap. 25: *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose, p. 274 - 285.
- REY, L. **Bases da parasitologia médica**. [s.e]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 349p.
- ROTHOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 77, p. 371 - 377, 1993.



- SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning - A laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory press, 1989. v.2 Cap. 14: PCR amplification.
- SAVVA, D. and HOLLIMAN, R. E. Diagnosis of toxoplasmosis using DNA probes. **Journal of Clinical Pathology**, v. **43**, p. 260 - 262, 1990.
- SCHRIEFER, M. E. *et al.* Detection of polymerase chain reaction-amplified malarial DNA in infected blood and individual mosquitoes. **Experimental Parasitology**, v. **73**, p. 311 - 316, 1991.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **90**, p. 649 - 651, 1996.
- SIBLEY, L. D. and BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. **359**, p. 82 - 85, 1992.
- SIBLEY, L. D. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. **Seminars in Cell Biology**, v. **4**, p. 335 - 344, 1993.
- SMITH, J. E. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology** v. **25 (11)**, p. 1301 - 1309, 1995.
- SUZUKI, D. T. *et al.* **An introduction to genetic analysis**. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1989. P. 407 - 408.

- SUZUKI, Y. *et al.* Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. **Infection and Immunity**, v. **61**, p. 2284 - 2288, 1993.
- SUZUKI, Y. and JOH, K. Effect of the strain of *Toxoplasma gondii* on the development of toxoplasmic encephalitis in mice treated with antibody to interferon-gamma. **Parasitology Research**, v. **80**, p. 125 - 130, 1994.
- TAKAHASHI, E. E. H. and ROSSI, C. L. Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma*. sp IgA antibodies in acute toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. **47**, p. 1101 - 1104, 1994.
- VERHOFSTED, C. and RENTERGHEM, J. P. Comparison of six commercial enzyme linked immunosorbent assays for detecting IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Pathology**, v. **42**, p. 1285 - 1290, 1989.
- VINHAL, F. A. *et al.* Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis: detection of low avidity IgG specific to *Toxoplasma gondii*. **Applied Parasitology**, v. **35**, p. 1 - 7, 1994.
- WATERS, A. P. and McCUTCHAN, T. F. Ribosomal RNA: nature's own polymerase amplified target for diagnosis. **Parasitology Today**, v. **6**, p. 56 - 59, 1990.
- WERK, R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? **Review of Infection Disease**, v.7, p. 449 - 457, 1985.

WONG, S. Y. and REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**,  
v. 7, p. 299 - 316, 1993.