

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM
GANGLIOSÍDEOS NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS
(C57BL/6) COM *Toxoplasma gondii* E EM
ENSAIOS DE INVASÃO EM FIBROBLASTOS
HUMANOS**

Cristiane Oliveira de Menezes

Uberlândia-MG

Dezembro-2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM
GANGLIOSÍDEOS NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS
(C57BL/6) COM *Toxoplasma gondii* E EM
ENSAIOS DE INVASÃO EM FIBROBLASTOS
HUMANOS**

Cristiane Oliveira de Menezes

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**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

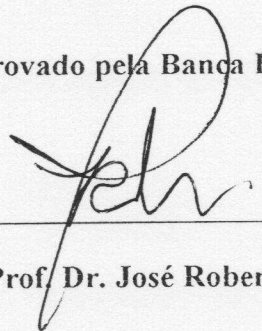
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM
GANGLIOSÍDEOS NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS
(C57BL/6) COM *Toxoplasma gondii* E EM
ENSAIOS DE INVASÃO EM FIBROBLASTOS
HUMANOS**

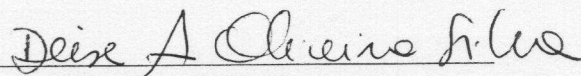
Cristiane Oliveira De Menezes

Aprovado pela Banca Examinadora em 18/12/03 Nota 100.0

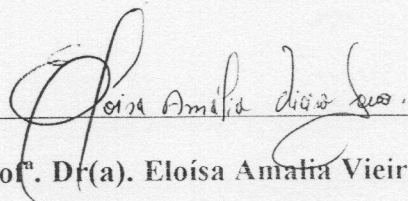


Prof. Dr. José Roberto Mineo

Barbosa
Universidade Federal de Uberlândia
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas



DVM. Deise Aparecida de Oliveira Silva



Prof.ª Dr(a). Eloísa Anália Vieira Ferro

Uberlândia-MG

Dezembro-2003

**"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que esta na raiz de toda ciência e arte".
(Albert Einstein)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e paciência, aos meus pais, pelo esforço e confiança em mim, pois através deles pude concluir um curso superior e aprender mais sobre a vida, a ciência e as pessoas. Aos meus familiares, a tia Conceição, a tia Rosaura e ao tio Delwey. Ao professor José Roberto Mineo.

A atenciosidade e a amizade de Danielle Reis Napolitano. A ajuda experiente de Neide Maria da Silva. Ao Fernando Lourenço. Agradeço também a ajuda do Senhor Rui e de Anderson, técnicos do Laboratório de Histologia da UFU, a todos que me ajudaram e que acreditaram em mim.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	5
3- MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1. Animais experimentais	6
3.2. Parasitos	6
3.3. Infecção experimental e coleta de material	6
3.4. Tratamento de camundongos com uma mistura de gangliosídeos	7
3.5. Coloração pela Hematoxilina -Eosina	8
3.6. Reação de Imunohistoquímica	8
3.7. Análise Histopatológica	9
3.8. Tratamento de fibroblastos humanos e de <i>T. gondii in vitro</i> com gangliosídeos	10
4- RESULTADOS	12
4.1. Alterações histopatológicas nos órgãos periféricos de camundongos C57BL/6	12
4.2. Alterações histopatológicas no SNC de camundongos C57BL/6	15
4.3 Análise do tratamento de fibroblastos humanos e de <i>T. gondii in vitro</i> com gangliosídeos	17
5- DISCUSSÃO	21
6- CONCLUSÕES	26
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMO

A resposta inflamatória induzida no SNC pela infecção por *Toxoplasma gondii* pode ser prejudicial ao hospedeiro. Neste trabalho foi investigada a influência de gangliosídeos no desenvolvimento das lesões e parasitismo. Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e tratados ou não com gangliosídeos para se avaliar o grau de lesões e presença de parasitos em diferentes órgãos. Por análise histopatológica e imunohistoquímica foram observadas lesões brandas nos órgãos periféricos, que foram caracterizadas pela presença de infiltrados inflamatórios mononucleados e não foram observados taquizoítas ou cistos. No SNC, as lesões foram caracterizadas por manguitos perivasculares, infiltrados inflamatórios e meningite, característicos de meningoencefalite e presença de cistos. Dos grupos infectados, os Grupos 2 (animais infectados e tratados com gangliosídeos 7 dias antes da infecção) e 5 (animais infectados e tratados com gangliosídeos 7 dias depois da infecção) apresentaram lesões graves e os Grupos 3 (animais infectados e tratados com salina) e 4 (animais infectados e tratados com gangliosídeos no dia da infecção) lesões moderadas. Em experimentos *in vitro*, fibroblastos e taquizoítas tratados com gangliosídeos separadamente ou juntos, em ensaio de invasão, apresentaram diminuição da invasão celular e aumento de mitoses em fibroblastos. Em conclusão o tratamento *in vivo* com gangliosídeos não diminuiu o número de cistos no SNC e *in vitro* reduziu a invasão celular por *T. gondii*.

Palavras-chaves: gangliosídeos, *T. gondii* e óxido nítrico.

1- INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário cosmopolita, parasito intracelular obrigatório de células nucleadas de animais homeotermos, e causador da toxoplasmose em diferentes espécies de aves e mamíferos, incluindo o homem. A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns causadas por parasitos. Com o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis e específicos, nas últimas duas décadas, observa-se que a toxoplasmose está disseminada entre muitas populações humanas e animais. Estima-se que cerca de 1/3 da população adulta do mundo tenha sido infectada por este patógeno (TENTER *et al.*, 2000).

T. gondii apresenta três estágios infecciosos - os taquizoítas (do grego *tachys* = rápido; em grupos ou clones), formas que apresentam uma rápida proliferação na célula hospedeira, ocorrendo principalmente na fase aguda da doença; os bradizoítas (do grego *bradys* = lento; em cistos teciduais), formas que por estresse imposto pelo sistema imunitário encontram-se dentro de cistos sob replicação lenta (fase crônica); e os esporozoítas (presentes em oocistos), que correspondem às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito que ocorre no intestino de felídeos (DUBEY *et al.*, 1998).

Em indivíduos imunocompetentes a infecção geralmente é assintomática. Os indivíduos imunocomprometidos apresentam as mais sérias formas da doença, como os pacientes que se submeteram à cirurgia para transplante de órgãos e sofrem tratamento imunossupressivo, aqueles que são submetidos a tratamentos quimioterápicos por apresentarem neoplasias, ou em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Nestes casos os cistos podem ser

reativados, com liberação de taquizoítas, causando infecção disseminada que pode ter sérias conseqüências como miocardite, retinocoroidite toxoplásmica e encefalite, sendo esta a principal manifestação da toxoplasmose em pacientes com AIDS, os quais apresenta lesões multifocais no Sistema Nervoso Central (SNC) (LUFT & REMINGTON, 1992). Múltiplos abscessos cerebrais, caracterizados por uma zona central avascular com material necrótico são observados. As áreas adjacentes são hiperêmicas e contêm muitos parasitos livres, células parasitadas e infiltrado de células mononucleares (HUNTER & REMINGTON, 1994).

Toxoplasmose pode ocorrer de duas formas: adquirida ou congênita. O termo toxoplasmose adquirida refere-se à infecção do indivíduo em algum período da fase pós-natal. *T. gondii* é transmitido por ingestão de água, verduras e legumes contaminados com oocistos, consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos e raramente por transplante de órgão, transfusão ou acidente laboratorial (TENTER *et al.*, 2000).

A infecção congênita pode ocorrer quando uma mulher é infectada, na maioria das vezes durante a gestação ou por ocasião de reativação de infecção latente. Durante a parasitemia, o parasita atravessa a placenta e invade os tecidos do feto em desenvolvimento. Das crianças infectadas congenitamente e assintomáticas ao nascimento, aproximadamente 80% desenvolverão em algum período da vida seqüelas neurológicas e/ou oculares (ROTHOVA, 1993), como hidrocefalia, calcificação intracraniana e retinocoroidite. As conseqüências da infecção congênita dependem do tempo de gestação, sendo mais grave a infecção adquirida durante os primeiros estágios de gravidez (HALL, 1992).

Infecções com diferentes patógenos intracelulares, incluindo *T. gondii* induzem a síntese de interferon-gama (IFN- γ) e interleucina (IL)-10 (IL-10) simultaneamente (KHAN *et al.*, 1995). Em condições normais, a imunopatologia induzida pela infecção por *T. gondii* é mínima. Entretanto, se não controlada por citocinas imunoregulatórias, ocorre uma forte resposta imune do tipo 1 (Th1) que pode levar a patologia inflamatória mediada por células T. Experimentos anteriores mostram que na ausência de IL-10 na fase aguda da infecção, camundongos apresentam patologia hepática aumentada e mortalidade acelerada, sendo estes efeitos uma conseqüência da produção aumentada das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1996). Recentemente, foi observado que na ausência de IFN- γ , camundongos desenvolvem uma infecção aguda fatal, com uma reduzida reação inflamatória e

multiplicação sem controle de taquizoítas. Entretanto, na ausência da sintase do óxido nítrico, um fator que contribui para o controle da multiplicação do parasita e modula reações inflamatórias, os animais não conseguem controlar o parasitismo cerebral, desenvolvem encefalite com uma reação inflamatória intensa e morrem no início da fase crônica (SILVA *et al.*, em preparação).

Uma função importante da citocina IFN- γ é a ativação de macrófagos, resultando na indução do gene da enzima sintase induzível do óxido nítrico (iNOs) e síntese de níveis elevados de radicais intermediários do nitrogênio, principalmente do óxido nítrico (NO) (JAMES, 1995). Experimentos *in vitro* têm mostrado a importante ação de IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) na indução da iNOs por macrófagos e subsequente controle da infecção por *T. gondii* (SIBLEY *et al.*, 1991; LANGERMANS *et al.*, 1992; REIS *et al.*, 2001).

Uma terapia efetiva para o tratamento da encefalite toxoplásmica é a combinação de pirimetamina, (inibidor da dihidrofolato redutase) e a sulfadiazina (ou trisulfapirimidinas). Esta combinação fornece bloqueio seqüencial do metabolismo do ácido fólico e atua contra o *Toxoplasma*. Entretanto, a atividade desta combinação é limitada ao estágio de taquizoíta, sendo que os cistos permanecem viáveis e podem reiniciar a infecção. Uma ampla variedade de agentes quimioterapêuticos têm sido desenvolvidos contra o parasito, mas ou não são eficazes contra os estágios de taquizoítas e cistos ou são tóxicos para o hospedeiro. Existe crescente necessidade para o desenvolvimento de nova quimioterapia anti-Toxoplasma. A potente resposta inflamatória induzida no SNC pela infecção por *T. gondii*, muitas vezes pode ser prejudicial ao hospedeiro. O uso de drogas que auxiliem na mielinização de células nervosas poderia potencialmente contribuir para o tratamento de encefalites e lesões no SNC causadas pelo parasito.

Gangliosídeos são glicosíngolipídeos, contendo ácido siálico em suas cadeias, encontrados nas membranas celulares de mamíferos, particularmente abundantes em células neuronais (PYO *et al.*, 1999). Os gangliosídeos estão implicados em processos de desenvolvimento, diferenciação e regeneração neuronal, e são capazes de ativar células microgliais para produção de óxido nítrico, fator de necrose tumoral (TNF) e aumento da expressão de cicloxigenase-2 (PYO *et al.*, 1999). A indução destes mediadores inflamatórios pode contribuir para a eliminação de patógenos intracelulares como *Toxoplasma gondii* (NAKANO *et al.*, 2002). Além de induzir a produção de reativos de oxigênio, gangliosídeos estimulam a fusão fagossomo-lisossomo, um evento importante que ocorre dentro das células

fagocíticas para eliminação de patógenos intracelulares (YAMAGUCHI *et al.*, 1997). Vários estudos têm sido realizados a fim de elucidar o envolvimento de gangliosídeos na ativação da resposta imunológica (PYO *et al.*, 1999) e na defesa contra infecções (YAMAGUCHI *et al.*, 1997). Dessa forma, o possível uso de gangliosídeos poderia contribuir para o tratamento da toxoplasmose.

Foi demonstrado que a administração de gangliosídeos exógenos pode retardar, e até reverter, a degeneração neuronal provocada por neuropatia diabética, a principal complicação do diabetes mellitus (MONTENERO *et al.*, 1983; NORIDO *et al.*, 1984; TRIBAN *et al.*, 1989). Gangliosídeos também têm sido estudados no tratamento de tumores (CHU *et al.*, 2000; DENG *et al.*, 2002; PARIS *et al.*, 2002), e de várias doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer (SVENNERRHOLM *et al.*, 2002) e doença de Parkinson (JIMENEZ-JIMENEZ & MOLINA, 1997).

2- OBJETIVOS

1- Relatar o efeito do tratamento com gangliosídeos na mortalidade, parasitismo do SNC e lesões teciduais em camundongos C57BL/6 infectados experimentalmente com *T. gondii*. Definir o efeito do tratamento com gangliosídeos nas lesões teciduais induzidas pela infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *T. gondii*.

2- Definir o efeito do tratamento com gangliosídeos em ensaios de invasão de *T. gondii* em fibroblastos humanos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Camundongos isogênicos C57BL/6 foram mantidos em condições livres de patógenos específicos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal (LEA), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal De Uberlândia (UFU). Todos os animais utilizados neste estudo foram fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, pesando de 25 a 30 g.

3.2. Parasitos

Foi utilizada a cepa de baixa virulência ME-49 de *T. gondii* para infectar animais neste estudo. A manutenção da cepa foi feita por inoculação intraperitoneal de camundongos C57BL/6 com 20 cistos de *T. gondii*. Um mês após a inoculação os cistos cerebrais foram coletados para infectar outros animais.

3.3. Infecção experimental e coleta de material

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, intraperitonealmente e sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos periféricos (fígado, baço, pulmão, coração e rins) assim como o SNC foram coletados. Os órgãos coletados foram

fixados em formol tamponado a 10% e, posteriormente, incluídos em parafina. para posterior análise histopatológica e imunohistoquímica.

3.4. Tratamento de camundongos com uma mistura de gangliosídeos

Para observar o efeito do tratamento com gangliosídeos na diminuição ou resolução de lesões patológicas induzidas pela reação inflamatória em decorrência da infecção por *T. gondii*, os animais foram tratados com uma mistura de gangliosídeos contendo GM1, GD1a, GD1b e GT1b (Sinaxial; TRB Pharma, Campinas, SP). A droga foi administrada por via intraperitoneal em doses diárias de 10 mg/Kg (NORIDO *et al.*, 1984), durante 30 dias para cada grupo, em 5 grupos de n = 3:

Grupo 1: Animais não infectados e tratados com gangliosídeos

Grupo 2: Animais infectados e tratados com gangliosídeos 7 dias antes da infecção.

Grupo 3: Animais infectados e tratados com salina por 30 dias subseqüentes.

Grupo 4: Animais infectados e tratados com gangliosídeos no dia da infecção.

Grupo 5: Animais infectados e tratados com gangliosídeos 7 dias depois da infecção. Os animais foram tratados a partir de sete dias de infecção, pois nesta fase é quando se observa a infecção do SNC por este parasita (SILVA *et al.*, 2002a,b).

Durante o tratamento com a droga os grupos de animais foram acompanhados quanto à mortalidade e os seus órgãos (SNC, fígado, baço, rins, pulmão, coração) foram coletados para posterior análise histopatológica e imunohistoquímica após 30 dias de infecção.

3.5. Coloração pela Hematoxilina-Eosina

Cortes de 4 μm de espessura foram feitos em micrótomo Spencer 820 e os cortes teciduais foram desparafinados em xilol durante 30 minutos e depois re-hidratados em concentrações decrescentes de álcoois, (100, 90, 80 e 70%) durante 3 minutos cada. A seguir as lâminas contendo os cortes foram imersas em hematoxilina de Harris por 1 minuto. Procedeu-se a uma lavagem em água corrente durante 10 minutos, sendo logo as lâminas imersas em eosina por 40 segundos e lavadas em água corrente rapidamente. Para montagem das lâminas, estas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois (70, 80, 90 e 100%), durante 3 minutos cada. A seguir as lâminas receberam um banho de xilol/álcool (v/v) por 1 minuto e xilol por 15 minutos. As lâminas foram montadas em lamínula e resina de entellan.

3.6. Reação de imunohistoquímica

Para detecção de antígenos totais de *T gondii* foi utilizada antisoro policlonal produzido em coelhos contra a cepa RH como anticorpo primário.

A reação de imunohistoquímica foi realizada conforme Gosselin et al. (1986) com modificações.

Os cortes teciduais foram fixados em lâminas contendo substância aderente de PVC e os cortes teciduais foram desparafinados e rehidratados como anteriormente citado. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito incubando-se as lâminas durante 20 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3,0%. A seguir, as lâminas foram imersas em salina tamponada com fosfato (PBS), durante 5 minutos e o resgate de sítios antigênicos foi feito em forno microondas Sharp, potência média como descrito por Sharma et al., 1990. As lâminas foram imersas em tampão citrato constituído de 2,1g de ácido cítrico anidro em 1 litro de água destilada e NaOH 2 M até atingir o pH 6,0 e foram realizados 2 ciclos de 5 minutos e 2 ciclos de 4 minutos. As lâminas foram aclimatadas durante 20 minutos à temperatura ambiente e imersas em PBS durante 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas lâminas com Soro Albumina Bovina (BSA) a 1% durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Após este tempo, as lâminas foram incubadas com antisoro primário, durante toda a noite a 4°C. O antisoro primário consistiu de antisoro de coelho anti-*T. gondii*, cepa RH e foi utilizado na diluição de 1:1000. Como controle da reação, utilizou-se soro de coelho não imune na mesma diluição do antisoro primário. Após este período de incubação as lâminas foram imersas em PBS.

O antisoro secundário utilizado foi γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho biotinizada, na diluição de 1:1000 em PBS. As lâminas foram incubadas com o antisoro secundário, durante 30 minutos a 37°C; logo após, estas foram imersas em PBS. A reação foi amplificada com o complexo ABC peroxidase (ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA.) na diluição 1:200, durante 30 minutos a 37°C. Após este período as lâminas foram imersas em PBS. A reação foi revelada com uma solução cromógena, filtrada, que consistiu de 50 mg de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Amresco, Solon Ohio), diluída em 200 ml de PBS e 160 μ L de peróxido de hidrogênio 30% adicionada no momento do uso. As lâminas foram incubadas durante 3 minutos na solução cromógena. A contracoloração foi feita em hematoxilina de Mayer, durante 6 minutos à temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram imersas em água corrente durante 10 minutos. Finalizada a reação, procedeu-se à desidratação em concentrações crescentes de álcoois (70, 80, 90 e 100%), xilol e a montagem das lâminas foram feitas em lamínula e resina de entellan.

3.7. Análise Histopatológica

Para determinação do parasitismo tecidual por imunohistoquímica, o número de cistos e taquizoítas foi avaliado em ao menos 2 cortes teciduais de cada um dos 3 animais por grupo, sendo estes obtidos a partir de cortes semi-seriados (distância de 40 μ m entre eles). O parasitismo no SNC foi avaliado em cada seção do hemisfério cerebral e nos tecidos periféricos em 40 campos microscópicos de cada órgão.

Para análise das lesões patológicas induzidas por *T. gondii*, estas foram quantificadas em 40 campos microscópicos (aumento de 400X) nos órgãos periféricos e em um hemisfério cerebral no SNC. A análise das lesões foi feita de forma diferente nos diferentes órgãos. No fígado, focos inflamatórios foram quantificados, assim como áreas necróticas no parênquima quando presentes. No coração foram quantificadas infiltrados inflamatórios focais (30 leucócitos ou mais em proximidade com cada outro).

No pulmão foi analisada presença de infiltrados inflamatórios nos septos alveolares. As lesões inflamatórias foram graduadas em uma escala arbitrária quanto a sua extensão nos septos alveolares como sendo, suave (+), moderada (++), grave (+++).

Os rins foram também avaliados quanto à presença de infiltrados inflamatórios e as lesões foram graduadas em uma escala arbitrária como anteriormente citado. O baço foi avaliado quanto à hiperplasia de polpa branca e outras possíveis lesões patológicas.

Para comparação da patologia no SNC entre camundongos C57BL/6 tratados ou não com gangliosídeos em diferentes condições e infectados ou não com a cepa ME-49 de *T.gondii*, o desenvolvimento de encefalite foi avaliado em seções sagitais. Foi analisada a presença de células inflamatórias espalhadas pelo parênquima e nas meninges, manguito perivascular e contagem de infiltrados inflamatórios. Estes foram divididos em focais (nódulos gliais) e difusos, dependendo da proximidade das células inflamatórias. A maioria das células em um infiltrado inflamatório focal estão em contato direto com cada outra, formando um sítio contínuo de inflamação. Em um infiltrado difuso foram contadas pelo menos 30 células inflamatórias por campo microscópico espalhadas pelo parênquima. A gravidade das lesões patológicas foi também avaliada em uma escala arbitrária. Uma inflamação suave foi graduada como (+), se existisse 1-15 nódulos gliais e infiltrados inflamatórios difusos no parênquima, nenhuma evidencia de infiltração de células inflamatórias nas meninges e discreto manguito perivascular. Uma inflamação moderada (++), se existisse 16-40 nódulos gliais e infiltrados inflamatórios difusos no parênquima, infiltração de células inflamatórias nas meninges e presença de manguito perivascular moderado. Uma inflamação grave (+++), se existisse mais que 50 nódulos gliais e infiltrados inflamatórios difusos no parênquima, intensa infiltração de células inflamatórias nas meninges e presença acentuada de manguito perivascular.

3.8. Tratamento de fibroblastos humanos e de *T. gondii* in vitro com gangliosídeos

Foram organizados 4 grupos:

1-Fibroblastos humanos tratados com gangliosídeos durante 2 horas antes da infecção por *T. gondii*.

2-Taquizoítas de *T. gondii* tratados com gangliosídeos durante 1 hora antes da infecção em fibroblastos humanos não tratados.

3-Tratamento de fibroblastos concomitantemente com a infecção por *T. gondii*.

4-Controles.

Fibroblastos humanos do prepúcio (HFF), na concentração de 4×10^4 células/200 μ l, foram adicionados às placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro. Após 1 hora em repouso em capela de fluxo laminar à temperatura ambiente, foram adicionados 200 μ l de RPMI I640 contendo 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e, em seguida, as placas foram incubadas por 48 horas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C.

Após este período, foi utilizado Sinaxial na concentração de 500 μ g/ml para tratar os fibroblastos humanos antes da infecção, durante 2 horas a 37°C (Grupo 1), assim como, os taquizoítas da cepa ME-49 de *T. gondii* por 1 hora a 37°C antes da infecção (Grupo 2). A seguir, os fibroblastos humanos tratados com Sinaxial por 2 hora a 37°C foram infectados com taquizoítas na proporção 3:1 (taquizoítas : células), incubando-se por 3 horas para invasão celular. No terceiro grupo foram tratados simultaneamente fibroblastos e taquizoítas juntamente com Sinaxial e depois incubados por 3 horas.

Os controles foram representados por células não tratadas e taquizoítas não tratados incubados apenas com RPMI a 37°C por 3 horas. As lâminas de todos os grupos foram lavados 2 vezes com RPMI 10% acrescido ou não com Sinaxial de acordo com os grupos (tratados e controle) e incubados por 48 horas a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂.

Após este período as lâminas foram fixadas com metanol gelado por 30 min e coradas com May-greenwald por 1 min e Giemsa por 30 min a temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com resina de entellan.

3.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste T. de Student.

4- RESULTADOS

4.1. Alterações histopatológicas nos órgãos periféricos de camundongos C57BL/6

Os animais não infectados e tratados com gangliosídeos não apresentaram alterações inflamatórias aparentes nos órgãos periféricos. As lesões patológicas observadas nos órgãos periféricos de todos os animais infectados foram brandas aos 30 dias de infecção. No fígado estas se caracterizaram como infiltrados inflamatórios constituídos por células mononucleadas. Estes infiltrados se apresentaram organizados como focos (Figura 1A) e estes foram quantificados (Tabela 1).

No pulmão dos animais infectados as lesões se caracterizaram pela presença de infiltrados inflamatórios nos septos alveolares, constituídos por células mononucleadas (Figura 1B). Os infiltrados inflamatórios observados nos animais infectados foram discretos, sendo que a maior parte do tecido pulmonar analisado apresentava-se sem lesões aparentes. Não houve diferença no grau de lesões pulmonares entre os diferentes grupos de animais infectados (Tabela 1).

Nos rins foi observada a presença de infiltrados inflamatórios discretos em alguns glomérulos renais de animais infectados (Figura 1C), entretanto, não foi observada diferença na intensidade de inflamação tecidual entre os diferentes grupos de animais infectados (Tabela 1).

As lesões cardíacas foram brandas aos 30 dias de infecção com *T. gondii* e se caracterizaram por infiltrados inflamatórios mononucleados (células inflamatórias entremeadas entre as fibras) (Figura 1D e Tabela 1).

As lesões esplênicas se caracterizaram por hiperplasia de polpa branca o que significa reatividade do órgão, devido à infecção por *T. gondii*.

Tabela 1: Avaliação das lesões patológicas nos órgãos periféricos de camundongos C57BL/6 infectados ou não com *T. gondii* e tratados ou não com gangliosídeos^a.

Grupos experimentais ^b	Análise Histopatológica			
	Fígado ^c	Pulmão ^d	Coração ^e	Rins ^f
Grupo 1	-	-	-	-
Grupo 2	10 ± 6,1	+	3,3 ± 2,5	+
Grupo 3	10,3 ± 2,1	+	2 ± 1	+
Grupo 4	9,7 ± 0,6	+	2 ± 0	+
Grupo 5	6,7 ± 1,2	+	1 ± 1	+

^aCamundongos C57BL/6 foram infectados por via intraperitoneal com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Três camundongos foram utilizados por grupo experimental.

^bGrupos experimentais:

Grupo 1: animais não infectados e tratados com gangliosídeos.

Grupo 2: animais infectados e tratados com gangliosídeos 7 dias antes da infecção.

Grupo 3: animais infectados e tratados com salina

Grupo 4: animais infectados e tratados no dia da infecção.

Grupo 5: animais infectados e tratados com gangliosídeos 7 dias depois da infecção.

^{c,e}Infiltrados inflamatórios foram quantificados em 40 campos microscópicos (aumento de 400X) em cada seção de cada órgão.

^{d,f}As lesões inflamatórias no pulmão e rins foram graduadas em uma escala arbitrária quando à sua extensão como sendo (+)suave, (++)moderada, (+++)grave.

Todas as lesões foram visualizadas por coloração com H&E.

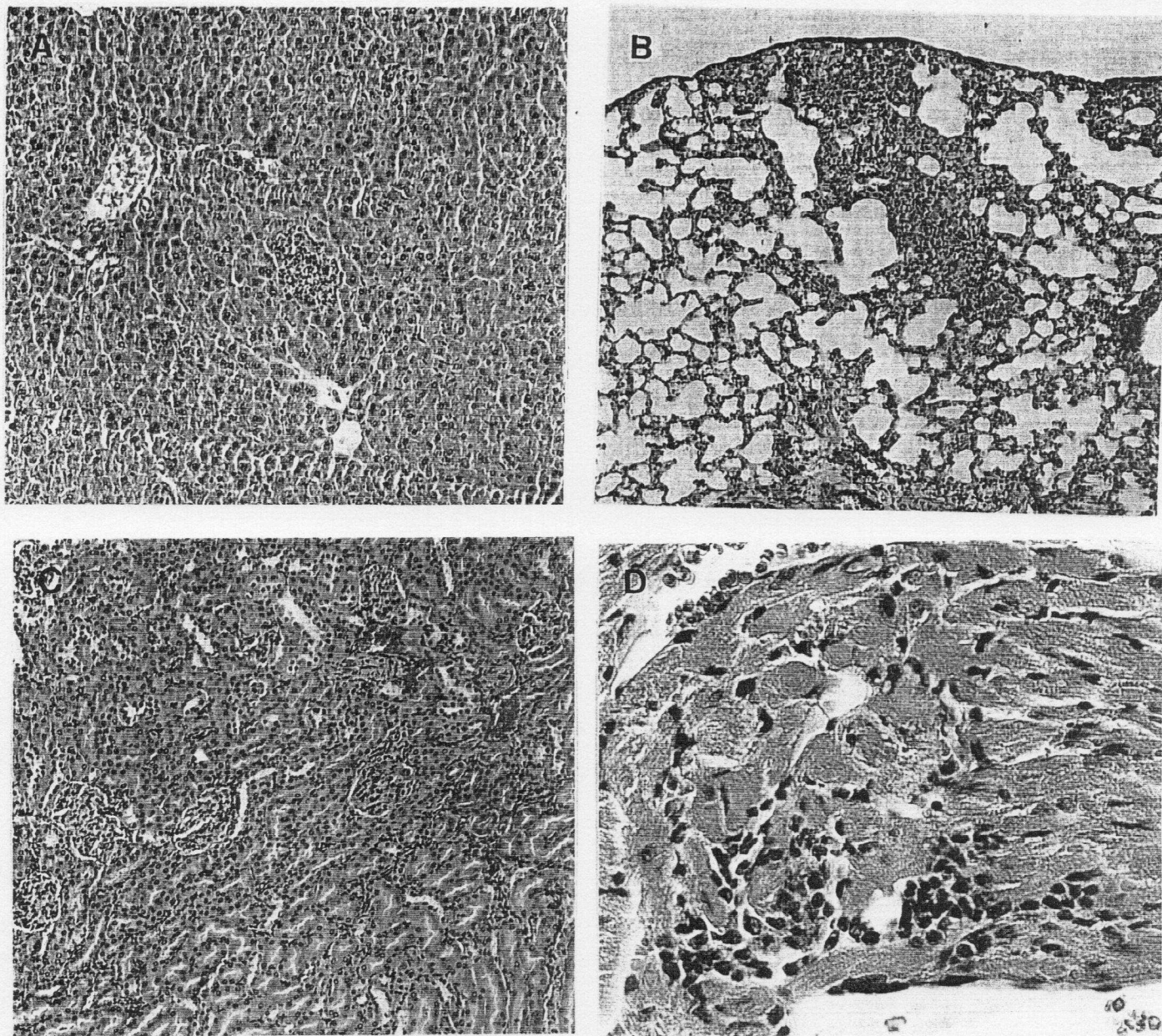


Figura 1- Alterações histopatológicas nos tecidos periféricos de camundongos C57BL/6 aos 30 dias de infecção com *T. gondii* e tratados com gangliosídeos 7 dias antes da inoculação do parasito e durante todo o período experimental. Observa-se a presença de um foco inflamatório no fígado (A), células inflamatórias nos septos alveolares intercaladas com áreas normais de tecido pulmonar (B), infiltrados inflamatórios nos glomérulos renais (C) e um infiltrado inflamatório entremeado entre as fibras cardíacas (D); A,B,C, $\times 66$; D, $\times 257$, HE.

4.2. Alterações histopatológicas no SNC de camundongos C57BL/6

Os animais não infectados e tratados com gangliosídeos não apresentaram lesões inflamatórias no SNC. Entretanto, todos os animais infectados apresentaram lesões no SNC. As alterações inflamatórias foram observadas em todo SNC, sem predileção por área. As lesões foram caracterizadas por manguitos perivasculares constituídos por células inflamatórias mononucleadas e infiltrados inflamatórios mononucleados organizados como focos (nódulos gliais.) (Figura 2A e 2B). Foram observadas também células inflamatórias espalhadas pelo parênquima, constituindo os infiltrados difusos. Alguns animais também apresentaram células inflamatórias nas meninges (Figura 2C). Estas lesões são características de uma meningoencefalite. Em geral as lesões inflamatórias não foram observadas em áreas próximas aos parasitos (Figura 2D). Apesar de apresentarem uma meningoencefalite importante, as lesões foram mais brandas no SNC de animais C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados com gangliosídeos ou salina no dia da infecção, quando comparadas com as de animais infectados e tratados 7 dias antes ou 7 dias após a infecção (Tabela 2). Os animais destes dois últimos grupos apresentaram uma meningoencefalite mais grave.

Tabela 2: Avaliação das lesões patológicas no Sistema Nervoso Central de camundongos C57BL/6 infectados ou não com *T. gondii* e tratados ou não com gangliosídeos^a.

Grupos experimentais ^b	Análise Histopatológica ^c	Número de Cistos ^d
Grupo 1	-	-
Grupo 2	+++	6,3 ± 1,2
Grupo 3	++	5,7 ± 4,0
Grupo 4	++	3,7 ± 1,5
Grupo 5	+++	12,0 ± 14,0

^aCamundongos C57BL/6 foram infectados por via intraperitoneal com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Três camundongos foram utilizados por grupo experimental.

^bGrupos experimentais:

Grupo 1: animais não infectados e tratados com gangliosídeos.

Grupo 2: animais infectados e tratados com gangliosídeos 7 dias antes da infecção.

Grupo 3: animais infectados e tratados com salina.

Grupo 4: animais infectados e tratados no dia da infecção.

Grupo 5: animais infectados e tratados com gangliosídeos 7 dias depois da infecção.

^cDuas seções sagitais de cada camundongo foram examinadas por coloração por H&E para lesões histopatológicas. O grau de inflamação foi avaliado como (+) suave, (++) moderada ou (+++) grave.

^dOs cistos foram visualizados por imunohistoquímica e foram quantificados por seção sagital em ao menos 2 seções não contíguas por camundongos (distância entre elas 40 µm).

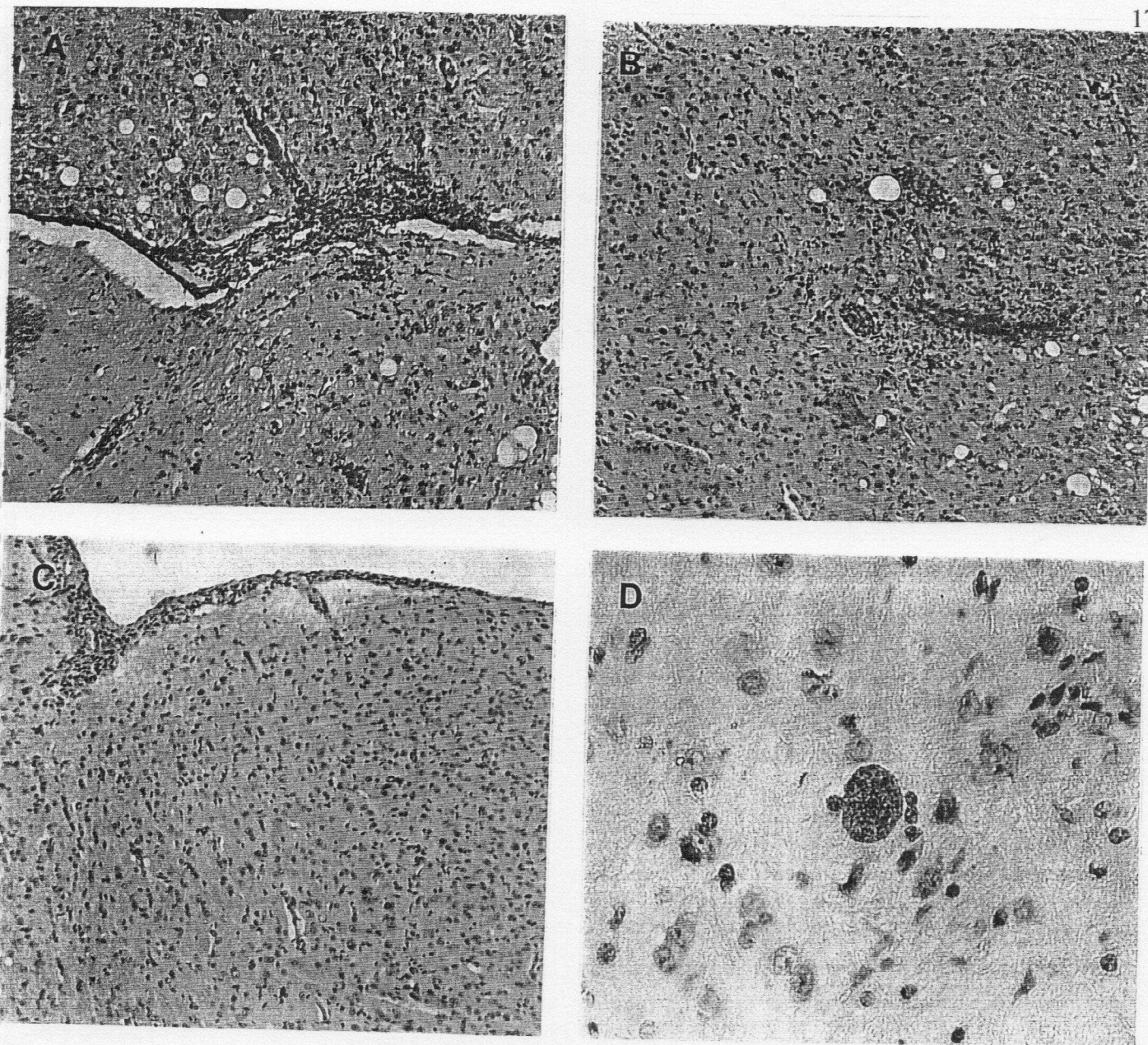


Figura 2 – Alterações histopatológicas no Sistema Nervoso Central de camundongos C57BL/6 aos 30 dias de infecção com *T. gondii* e tratados com glangliosídeos 7 dias antes da inoculação do parasito e durante todo o período experimental. Observa-se a presença de manguitos perivascularres (A,B), pequeno nódulo glial (A,B), células inflamatórias nas meninges (C) e cisto (D); A,B,C, $\times 66$; D, $\times 257$, HE.

4.3. Análise do tratamento de fibroblastos humanos e de *T. gondii* com gangliosídeos *in vitro*

Nos fibroblastos humanos tratados com Sinaxial por 2 horas antes da infecção houve uma diminuição não siginificativa ($p > 0,05$) da invasão celular por taquizoítas de *T. gondii* em comparação com o grupo controle, devido a $n=2$, mas, numericamente, notamos uma tendência a diminuição da invasão e o aumento de mitoses.. Foi observada também um maior número de mitoses nos fibroblastos em mitose tratados com Sinaxial, do que no grupo controle. Entretanto, o uso terapêutico de gangliosídeos concomitantemente com a infecção por taquizoítas não parece ter sido eficaz contra a invasão celular pelo parasito, mas influenciaria ao surgimento de mitoses (Tabela 3).

Nos parasitos tratados com Sinaxial por 1 hora antes da infecção em fibroblastos humanos, também foi observada uma diminuição não siginificativa ($p > 0,05$) na invasão celular, devido a $n=2$ Entretanto, as células infectadas por estes parasitos não apresentaram mais figuras de mitose em comparação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da influência de gangliosídeos em ensaios de invasão de taquizoítas de *T. gondii* em fibroblastos humanos e no processo de mitose.

Fibroblastos tratados com Sinaxial por 2 horas antes da infecção		
	Invasão	Mitose
Sinaxial	4,0%	3,3%
Controle	7,3%	0,5%
Taquizoítas tratados com Sinaxial por 1 hora antes da infecção		
	Invasão	Mitose
Sinaxial	1,7%	0
Controle	4,0%	0,8%
Tratamento de Fibroblastos na hora da infecção		
	Invasão	Mitose
Sinaxial	4,2%	3,2%
Controle	4,0%	0

5- DISCUSSÃO

Gangliosídeos são encontrados na superfície de células de mamíferos e estão envolvidos na regulação de vários fenômenos biológicos. No entanto, os mecanismos detalhados envolvidos neste processo não são conhecidos (BHUNIA *et al.*, 2002). Supõe-se que os glicosíngolípídeos (gangliosídeos) exerçam um papel decisivo nas interações célula-célula e célula-substrato, inclusive adesão, proliferação, diferenciação celular e apoptose. Além disso, mudanças no perfil de glicolípídeos na superfície celular sugerem desordens biológicas, tais como, transformações malignas. Essas modificações na composição de gangliosídeos têm sido estudadas em diferentes tumores para esclarecerem os mecanismos envolvidos neste fenômeno (BERRA *et al.*, 1997).

Estudos com células de camundongos BALB/3T3 que foram infectadas com H-ras oncogene ou K-ras oncogene demonstraram alterações na composição de gangliosídeos nas linhagens de células transformadas. GM1 e GD1a foram encontradas em todas essas células modificadas, entre as quais houve um aumento do conteúdo de GM3 e diminuição do conteúdo de GD3, GD1a e GM1a (SUZUKI *et al.*, 1989).

A produção de GM3 por células tumorais é capaz de induzir a produção de NO em macrófagos, presentes no peritônio de camundongos, o qual é responsável pela citotoxicidade contra células tumorais (DING *et al.*, 1989).

Gangliosídeos de células do sistema imune são também capazes de inibir a proliferação de tumores. Em um estudo foram detectados na membrana de macrófagos de camundongos dois

tipos de gangliosídeos que inibiram a divisão de mastocitoma P815 presente em camundongos (SCHAADE *et al.*, 2000).

Resultados de estudos mostraram que o tratamento com a vitamina E poderia reduzir o metabolismo na expressão de glicoesfingolipídeos (GSL) na superfície celular de culturas de células murinas K3T3, e também reduzir a tumorigenicidade de células transplantadas em camundongos com dieta rica em vitamina E (YOGESWARAN & MBAWUIKE, 1986).

Por outro lado existem glicoesfingolipídeos, tais como, gangliosídeos (DLG) derivados de linfoma de Dalton (DL) que poderiam inibir a produção de NO por macrófagos *in vitro* e *in vivo* (KUMAR *et al.*, 1996).

A concentração e a composição dos gangliosídeos varia de célula para célula (THAMPOE *et al.*, 1989) e na mesma célula em diferentes períodos de desenvolvimento.

Em uma mesma célula pode variar a composição de gangliosídeos em sucessivas passagens de cultura. GM3, GD3 e GD1 foram encontrados em sucessivos extratos de subcultura de fibroblastos humanos. GD1 foi encontrado em todos os extratos, mas em menor proporção. Nesses extratos encontrou-se mais GD3 do que GM3, devido ao aumento de GD3 síntase (SCIANNAMBLO *et al.*, 2002).

Outros trabalhos demonstraram o envolvimento de gangliosídeos na proliferação e migração celular. Durante o desenvolvimento do SNC em ratos o GD3 estaria envolvido na migração celular (SANTIAGO *et al.*, 2001).

Em outros trabalhos a respeito da proliferação celular o GM1 funcionaria como receptor na estimulação da mitose em células de Schwann, juntamente com os receptores MBP (1-44), MBP (152-167) e bFGF (TZENG *et al.*, 1999).

Há diferentes tipos de gangliosídeos – GM3, GM1, GT1b, GD1a, GD1b, GD3 e outros, presentes em vários tipos celulares (normais e tumorais). Alguns gangliosídeos podem induzir ou inibir a produção de NO e de COX-2. GM3 induz a produção de NO por macrófagos (DING *et al.*, 1998), assim como o GD3 (BHUNIA *et al.*, 2002). Trisialo-gangliosídeos (GT1b) também induzem a produção de NO, de TNF- α e a expressão de COX-2 (PYO *et al.*, 1999).

Monosialo-gangliosídeos (GM1), assim como o GD1a, induz a expressão de COX-2 mas produz pequeno efeito na produção de NO (PYO *et al.*, 1990; TSENG *et al.*, 1998).

A enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) liberada por patógenos é um importante agente patogênico em infecções pois, propicia a invasão de microrganismos em células de hospedeiros, ou seja, a PLA₂ esta envolvida na invasão celular por parasitos intracelulares, como o *T. gondii* e *Plasmodium ssp.* (SAFFER *et al.*, 1989; SAFFER & SCHWRTZMAN, 1991; BRAUN-BRETON *et al.*, 1994). A PLA₂ em humanos exerce a função em diversos processos celulares, incluindo digestão de fosfolipídeos e metabolismo, defesa da célula hospedeira, na transdução e toxicidade (DENNIS *et al.*, 1992; GLASER *et al.*, 1993; GELB *et al.*, 1994; ARNI & WARD, 1996; LESLIE, 1997; KRAMER & SHARP, 1997; MURAKAMI *et al.*, 1997).

Conforme Correa *et al.* (1993), a inibição de PLA₂ de *Trypanosoma cruzi*, tal como, a ação de gangliosídeos neuronais poderia intervir na sua penetração em células hospedeiras.

Em estudos *in vitro*, Bronia *et al.* (1999) utilizaram gangliosídeos derivados de cérebro de boi (Reflexan; Beta Laboratories, Buenos Aires), em culturas de *T. cruzi*, agindo diretamente na sua mobilidade e morfologia, mas não foram observadas alterações na invasão do parasito em células hospedeiras.

Ao contrário, em nossos experimentos *in vitro*, tratado com gangliosídeos, tanto dos taquizoítas de *T. gondii* por 1 hora antes da infecção como os fibroblastos humanos por 2 horas antes da infecção, levou a uma diminuição da invasão dos fibroblastos por *T. gondii*, com exceção dos fibroblastos tratados com gangliosídeos concomitantemente com a infecção. Desse modo, quando as células entram em contato com uma mistura de gangliosídeos, estes poderiam ativar o processo de mitose (Tabela 3).

Através deste experimento *in vitro* supôs-se que o uso profilático da mistura de gangliosídeo usada agiria como inibidor da invasão celular por *T. gondii* e como ativador de mitose.

Entretanto, nos experimentos *in vivo* de Bronia *et al.* (1999), o tratamento com gangliosídeos interferiu na evolução da infecção por *T. cruzi*. Diferentemente dos resultados obtidos por estes autores, nossos estudos *in vivo*, em que foram tratados quatro grupos de camundongos C57BL/6 infectados com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* com Sinaxial por 30 dias, não ocorreu inibição da invasão do parasita no SNC dos camundongos. Esses quatro grupos infectados apresentaram lesões moderadas (Grupo 3 e Grupo 4) e graves (Grupo 2 e Grupo 5) no SNC, caracterizadas pela presença de manguitos perivasculares constituídos por infiltrados

inflamatórios mononucleados organizados em focos (nódulos gliais) e difusos e de células inflamatórias nas meninges (meningoencefalite) (Tabela 2 e Figura 2C).

O uso da droga no Grupo 2 (animais infectados e tratados com Sinaxial por 7 dias antes da infecção e com posterior presença de lesões graves) e no Grupo 5 (animais infectados e tratados com Sinaxial por 7 dias depois da infecção e com posterior presença de lesões graves) poderia servir como um estímulo prévio ao aumento da produção de NO ou iNOs e conseqüentemente ao aumento das lesões no SNC, pois, provavelmente, a droga utilizada no experimento que apresenta número maior de gangliosídeos (GD1a, GD1b, GT1b) que estimularia a produção de NO, como consta na literatura analisada, proporcionou ao aparecimento de lesões graves (+++) nos grupos 2 e 5. Entretanto, todos os grupos infectados, com exceção do grupo 3 (tratado apenas com salina), que receberam a mesma droga (3 gangliosídeos que estimulam a produção de NO e 1 gangliosídeo que poderia inibir a sua produção, conforme a literatura estudada), não apresentaram lesões graves como nos Grupos 2 e 5. A possível diferença entre as lesões nos Grupos 2, 3, 4 e 5 estaria nas diferentes condições do tratamento. O Grupo 2 e 5 receberam a droga (estímulo prévio), estimulando as células neuronais a produzirem NO. Ao contrário, o Grupo 4 (animais infectados e tratados no dia da infecção) não recebeu a droga ou parasita antes (que seria o estímulo prévio) e desse modo, apresentou lesões moderadas (++) . Já o Grupo 3 (animais infectados e tratados com salina) recebeu o parasita que seria o estímulo único, mas não foi tratado e portanto apresentou lesões também moderadas.

Portanto, a causa do possível aumento da produção de NO e conseqüentemente das lesões nos grupos 2 e 5 seria o recebimento, de um estímulo prévio (droga ou parasita). Poderia denominar o Grupo 2 como "Grupo Profilático" e o Grupo 5 como "Grupo Terapêutico", e conforme a Tabela 2, a droga não seria eficaz nem na profilaxia e nem na terapêutica, mas seria um estímulo para o aumento da produção de NO em animais infectados com *T. gondii*.

Em relação a análise histopatológica dos órgãos periféricos (fígado, baço, pulmão, coração e rins), os animais dos 5 grupos não apresentaram cistos ou taquizoítas, mas todos, com exceção do Grupo 1 (não infectado), apresentaram lesões patológicas leves aos 30 dias de infecção (Tabela 1). As lesões dos órgãos periféricos dos quatro grupos infectados se caracterizaram pela presença de infiltrados inflamatórios mononucleados, sem apresentar diferença significativa entre os grupos.

Para elucidar esses achados a respeito da inibição da invasão celular por *T. gondii*, estão sendo realizados novos estudos *in vivo* para avaliar a viabilidade da cepa RH de *T. gondii*, quando os parasitos são tratados com uma mistura de gangliosídeos (Sinaxial) antes da infecção em camundongos C57BL/6.

Estudos estão sendo realizados para comprovar se as lesões presentes no SNC dos camundongos infectados e tratados foram devido ao uso dos gangliosídeos presentes na droga que poderia aumentar a produção de NO.

6-CONCLUSÕES

6.1. Experimentos *in vivo*

O tratamento com gangliosídeos em camundongos C57BL/6 infectados com cistos de *T. gondii* não foi eficaz, pois o número de cistos dos animais infectados e tratados não foi significativamente diferente dos animais infectados e não tratados.

6.2. Experimentos *in vitro*

O uso de gangliosídeos em fibroblastos humanos induziu a uma diminuição da invasão celular por taquizoítas de *T. gondii* e ativação de mitoses.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂: a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.

BERRA, B.; COLOMBO, I.; MONTEGGIA, E.; MONTORFANO, G.; MORETTI, S.; RAPELLI, S.; SOTTOCORNOLA, E. Glycosphingolipid expression in solid tumours and transformed cell lines. **Indian Journal Biochemistry Biophys**, v. 34 n.1-2, p. 170-177, 1997.

BHUNIA, A. K.; SCHWARZMANN, G.; CHATTEERJEE, S. GD3 recruits reactive oxygen species to induce cell proliferation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277 n. (19), p. 16396-16402, 2002.

BRAUN- BRETON, C.; BLISNICK, T.; MORALES-BETOULLE, M. E.; BARALE, J. C.; LANGSLEY, G. Malaria parasites: enzymes involved in blood cell invasion. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 363-367, 1994.

BRONIA, D. H.; PEREIRA, B. M.; LUJAN, H. D.; FRETES, R. E.; FERNANDEZ, A.; PAGLINI, P. A. Ganglioside treatment of acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice promotes

long-term survival and parasitological. **Annual Tropical Medicine Parasitology**, v. 93, p. 341-350, 1999.

CHU, K. U.; RAVINDRANATH, M. H.; GONZALES, A.; NISHIMOTO, K.; TAM, W. Y.; SOH, D.; BILCHIK, A.; KATOPODIS, N.; MORTON, D. L. Gangliosides as targets for immunotherapy for pancreatic adenocarcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 1828-1836, 2000.

CORREA, S. G.; RIVELLO, V. E.; YRANZO-VOLONTE, N.; ROMERO-PIFFINGUER, M.; FERRO, M.E.; RIERA, C. M. Effect of gangliosides in the autoimmune response induced by liposome-associated antigens. **Autoimmunity**, v. 15, p. 195-200, 1993.

DENG, W.; LI, R.; GUERRERA, M. LIU, Y.; LADISCH, S. Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. **Glycobiology**, v. 12, p. 145-152, 2002.

DENNIS, E. A.; DEEMS, R. A.; YU, L. Extracellular phospholipase A₂. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 318, p. 35-39, 1992.

DING, Y.; MA, K.; TSUI, Z. C. Induction of nitric oxide production by ganglioside GM3 in murine peritoneal macrophages activated for tumor cytotoxicity. **In Vivo**, v. 12 n. 3, p. 357-361, 1989.

DUBEY, J.; LINDSAY, D. & SPEER, C. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11: p. 267-299, 1998.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on

CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ , and TNF- α . **The Journal of Immunology**, v. 157, p. 798-805, 1996.

GELB, M. H.; JAIN, M. K.; BERG, O. G. Inhibition of phospholipase A₂. **FASEB Journal**, v. 8, p. 916-924, 1994.

GLASER, K. B.; MOBILIO, D.; CHANG, J. Y.; SENKO, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, p. 92-98, 1993.

GOSSELIN, E. J.; CATE, C. C.; PETTENGILL, O. S. Immunocytochemistry: its evolution and criteria for its application in the study of epon-embedded cells and tissue. **American Journal of Anatomy**, v.175, p. 135-160, 1986.

HALL, S. M. Congenital toxoplasmosis. **British Medical Journal**, v. 305, p. 291-306, 1992.

HUNTER, C. A.; REMINGTON, J. S. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. **Journal of Infectious Disease**, v.170, p. 1057-1067, 1994.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiology Review**, v. 59, p. 533-547, 1995.

JIMENEZ-JIMENEZ, F. J. & MOLINA, J. A. Neuroprotective and neurorestorative therapy in Parkinson's disease. **Review in Neurology**, v. 2, p. 185-193, 1997.

KHAN, I. A.; MATSUURA, T. & KASPER, L. H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 185-195, 1995.

KRAMER, R. M. & SHARP, J. D. Structure, function and regulation of Ca^{2+} sensitive cytosolic phospholipase A_2 (cPLA $_2$). **FEBS Letters**, v. 410, p. 49-53, 1997.

KUMAR, A; PARAJULI, P.; SINGH, S. M. Gangliosides produced by a T cell lymphoma inhibit the production of reactive nitrogen intermediate by murine peritoneal macrophages. **Journal Clinical Biochemistry. Nutr.**, v. 21, p. 171-182, 1996.

LANGERMANS, J. A. M.; VAN DER HULST, M. E. B.; NIBBERING, P. H. et al. IFN- γ induced L-Arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . **The Journal of Immunology**, v. 148, p. 568-574, 1992.

LESLIE, C. C. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A_2 . **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 709-16, 1997.

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

MONTENERO, P.; MAROZZI, G. & CHIARAMONTE, F. Possibilità di impiego dei gangliosidi cerebrali nel trattamento della neuropatia diabetica periferica. **La Clinica Terapeutica**, Societa Editrice Universo – Via G.B. Morgagni,1 – Roma, p.167-173, 1983.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; SUMI, G.; INOUE, K. & KUDO, I. Regulatory functions of phospholipase A_2 . **Critical Reviews in Immunology**, v. 17, p. 225-283, 1997.

- NAKANO, Y.; HISAEDA, H.; SAKAI, T.; ISHIKAWA, H.; ZHANG, M.; MAEKAWA, Y.; ZHANG, T.; TAKASHIMA, M.; NISHITANI, M.; GOOD, R. A. & HIMENO, K. Roles of NKT cells in resistance against infection with *Toxoplasma gondii* and in expression of heat shock protein 65 in the host macrophages. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1-11, 2002.
- NORIDO, F.; CANELLA, R.; ZANONI, R. & GORIO, A. Development of diabetic neuropathy in the C57 BL/Ks (db/db) mouse and its treatment with gangliosides. **Experimental Neurology**, v. 83, p.221-232, 1984.
- PARIS, R.; MORALES, A.; COLL, O.; SANCHEZ-REYES, A. & GARCIA-RUIZ, C. Ganglioside GD3 sensitizes human hepatoma cells to cancer therapy. **Journal of Biological Chemistry**, 2002 sep 25 [epub ahead of print]
- PYO, H.; JOE, E.; JUNG, S.; LEE, S. H. & JOU, I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p.34584-34589, 1999.
- REIS, D. S.; SOUZA, M. A.; MINEO, J. R. & ESPINDOLA, F. S. Myosin V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 221-226, 2001.
- ROTHOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 77, n. 6, p. 371-377, 1993.
- SAFFER, L. D.; LONGKRUG, S. A & SCHWARTZMAN, J. D. The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 145-149, 1989.

- SAFFER, L. D. & SCHWARTZMAN, J. D. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration, **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 454-460, 1991.
- SANTIAGO, M. F.; BERREDO-PINHO, M.; COSTA, M. R.; GANDRA, M.; CAVALCANTE, I.; MENDEZ-OTERO, R. Expression and function of ganglioside 9-O-acetyl GD3 in postmitotic granule cell development. **Moll. Cell. Neurosci.**, v. 17 n. 3, p. 488-499, 2001.
- SCHAADE, L.; THOMSEN, R.; RITTER, K. Differentiation in murine mastocytoma induced by macrophage gangliosides. **Z. Naturforsch [C]**, v. 55(11-12), p. 1004-10, 2000.
- SCIANNAMBLO, M.; CHIGORNO, V.; PASSI, A.; VALAPERTA, R.; ZUCCHI, I.; SONNINO, S. Change of the ganglioside pattern and content in fibroblasts by high density cell population subculture progression. **Glycoconjugate Journal**, v.19 n. 3, p. 181-186, 2002.
- SHARMA, H. M.; KAUFFMAN, M. & MCGAUGHY, V. R. Improved immunoperoxidase staining using microwave slide drying. **Laboratory Medicine**, v. 21, n. 10, p. 658-660, 1990.
- SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. & FUKUTOMI, Y. Tumor necrosis factor- α triggers antitoxoplasmal activity of IFN- γ primed macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 147, p. 2340-2345, 1991.
- SILVA, N. M.; GAZZINELLI, R. T.; CARNEIRO, C. M.; VIEIRA, J. C. M. & TAFURI, W. L. The role of IFN- γ , and TNFRp55 and iNOS functions in inflammatory lesions in the peripheral organs and Central Nervous System (brain and spinal cord) from *Toxoplasma gondii* infected mice. (em preparação).
- SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F. L.; ALVAREZ-LEITE, J. I. & GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation

and kynurenine formation during *in vivo* infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous IFN-g and requirement of IRF-1. *Infection And Immunity*, v. 70, n. 2, p. 859-868, 2002.

SILVA, N. M.; TAFURI, W. L.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; MINEO, J. R. & GAZZINELLI, R. T. *Toxoplasma gondii*: *in vivo* expression of BAG-5 and cyst formation is independent of TNFRp55 receptor and inducible nitric oxide synthase functions. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 3, p. 261-270, 2002.

SUZUKI, Y.; HIDARI, K.; MATSUMOTO, M.; IKEDA, M.; TSUCHIDA, N. Altered ganglioside expression in ras-oncogene-transformed cells. *J. Biochem (Tokyo)*, v. 106 n.1, p. 34-37, 1989.

SVENNERHOLM, L.; BRANE, G.; KARLSSON, I.; LEKMAN, A. & RAMSTROM, I. Alzheimer disease – Effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dement Geriatr Cogn Disord.*, v. 14, p. 128-136, 2002.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R. & WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal of Parasitology*, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

THAMPOE, I. J.; FURUKAWA, K.; VELLE, E.; LLOYD, K. O Sialytransferase levels and ganglioside in melanoma and other cultured human cancer cells. *Cancer Res.*, v. 49, p. 6258-6264, 1989.

TRIBAN, C.; GUIDOLIN, D.; FABRIS, M.; MARINI, P.; SCHIAVINATO, A.; DONA, M.; BORTOLAMI, M. C.; GIAMBERARDINO, L. D. & FIORI, M. G. Ganglioside treatment and improved axonal regeneration capacity in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, v. 38, p.1012-1022, 1989.

TSENG, E. E.; BROCK, M. V.; LANGE, M. S.; TRONCOSO, J. C.; BLUE, M. E.; LOWENSTEIN, C. J.; JOHNSTON, M. V.; BAUMGARTNER, W. A. Monosialoganglioside GM1 inhibits neurotoxicity after hypothermic circulatory arrest. **Surgery**, v. 124 n.2, p. 298-306, 1998.

TZENG, S. F.; DEIBLER, G. E.; DEVRIES, G. H. Myelin basic protein and myelin basic protein peptides induces the proliferation of Schwann cells via ganglioside GM1 and the FGF receptor. **Neurochem Res**. v. 24 n.2, p. 255-260, 1999.

YAMAGUCHI, S.; MIYAZAKI, Y.; OKA, S. & YANO, I. Stimulatory effect of gangliosides on phagocytosis, phagosome-lysosome fusion, and intracellular signal transduction system by human polymorphonuclear leukocytes. **Glycoconjugate Journal**, v.14, p.707-714, 1997.

YOGEESSWARAN, G.; MBAWUIKE, I. N. Altered metabolism and cell surface expression of glycosphingolipids caused by vitamin E in cultured murine (K3T3) reticulum sarcoma cells. **Lipids**, v. 21 n.10, p. 643-647, 1986.