

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

**CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM *Rattus norvegicus*  
CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii* E  
SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM BLOQUEADOR  
DOPAMINÉRGICO E IMUNODEPRESSOR DA RESPOSTA IMUNE  
CELULAR**

**MARIA APARECIDA GUERRA LAGE**

**Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas**

**Uberlândia - MG  
Dezembro - 1995**

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

**CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM *Rattus norvegicus*  
CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii* E SUBMETIDOS À  
TRATAMENTO COM BLOQUEADOR DOPAMINÉRGICO E IMUNODEPRESSOR  
DA RESPOSTA IMUNE CELULAR**

**MARIA APARECIDA GUERRA LAGE**

**Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO MINEO**

**Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas**

**Uberlândia - MG  
Dezembro - 1995**

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

CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM *Rattus norvegicus* CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii* E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM BLOQUEADOR DOPAMINÉRGICO E IMUNODEPRESSOR DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

---

Maria Aparecida Guerra Lage

Aprovado(a) pela Comissão em 18/12/95 Conceito A = 100,0

Prof. Dr. José Roberto Mineo  
Orientador

Prof. Dr. Cesar Laerte Natal  
Co-Orientador

Prof. Dr. Oswaldo Marçal Júnior  
Conselheiro

Profª Ms. Nora-Ney S. Barcelos  
Coordenadora do Curso

Uberlândia, 22 de dezembro de 1995

## DEDICATÓRIA

A Deus, por me abençoar e me inspirar, por permitir a minha existência e iluminar sempre os meus passos na diretriz do bem.

À minha mãe, Rosa Maria Guerra Silva, pelo amor, pelo apoio moral, pelo exemplo de luta, perseverança, disciplina e dinamismo.

Ao meu irmão, Roberto Guerra Lage, pelo amor, incentivo e união.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pelos ensinamentos, pelo acesso, amizade e pela valorização e respeito do trabalho daqueles que estão iniciando a infinita jornada do saber.

Ao Prof. Dr. Cesar Laerte Natal, pelo acesso, amizade e paciência em ensinar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuiram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, em especial:

- A Deus, companheiro incansável de todas as horas.
- Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, meu orientador, pelo profissionalismo, respeito e ensinamentos valiosos que contribuiram para realização desse trabalho e minha formação científica.
- Ao Prof. Dr. Cezar Laerte Natal, meu co-orientador, pela dedicação em ensinar e orientar, contribuindo para minha formação e desenvolvimento desse trabalho.
- À Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela amizade, dedicação, responsabilidade nos experimentos, e principalmente por tudo que me ensinou.
- À minha avó Dorvalina, ao meu tio Silvio e ao meu avô Miguel, pelo amor, carinho e apoio aos meus estudos.
- Às amigas Tereza, Maria José, Luzia, Ivone, Marilú, Marlúcia e Rosimar, pelos mesmos ideais de luta e renovação interior, e pelo incentivo constante.
- À Glória, Maria das Graças e Daniela, pelo incentivo e amizade.
- A todos amigos, familiares e colegas dos Laboratórios de Imunologia e Fisiologia, que me incentivaram.

Muito obrigada.

...“E ainda que eu tenha o dom de profetizar  
e conheça todos os mistérios e toda a ciência  
e ainda que eu tenha tamanha fé ao ponto de  
transportar montes, se não tiver amor, nada serei.”  
(Paulo de Tarso, I Coríntios, cap. 12, v. 31)

“Quando alguém tem força para vencer a si  
mesmo, nasceu para grandes empreendimentos.”

Jean Baptiste Lacordaire (Séc. XIX)

## Resumo

Atualmente existe um grande número de pesquisas abordando a influência imunorregulatória do sistema neuroendócrino, sendo ativado em condições de quebra da homeostasia, como por exemplo em infecções e estresse. Vários são os fatores neuropsicológicos que podem permitir a instalação de doenças. Dentre os agentes etiológicos de infecções em humanos e animais, destaca-se o *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular obrigatório, capaz de invadir e replicar em todas as células animais nucleadas, causando a toxoplasmose. A toxoplasmose é uma zoonose que afeta grande parte da população de forma assintomática, sendo particularmente importante a forma congênita e a reativada em indivíduos imunodeprimidos.

Este trabalho teve como objetivos observar variações nos níveis de anticorpos anti-*T. gondii* em animais tratados com haloperidol e ciclofosfamida, bem como verificar possíveis modificações nas taxas de mortalidade e peso corporal.

A cinética da produção de anticorpos foi avaliada em ratos não-infectados e em ratos infectados cronicamente, tratados com haloperidol, ciclofosfamida e ciclofosfamida + haloperidol. Os animais que foram tratados com ciclofosfamida e ciclofosfamida + haloperidol apresentaram níveis mais altos de anticorpos e reativação da doença, com consequente morte.

# ÍNDICE

INTRODUÇÃO .....	01
OBJETIVOS .....	11
MATERIAL E MÉTODOS .....	12
1- Manutenção dos parasitas .....	12
2- Animais .....	12
2.1- Animais utilizados para manutenção dos parasitas .....	12
2.2- Animais utilizados nos experimentos .....	12
2.3- Divisão dos grupos de animais .....	12
3- Preparação do inóculo .....	13
4- Tratamento .....	13
5- Pesagem dos animais .....	14
6- Teste de catatonia .....	14
7- Sangria dos animais .....	14
8- Estocagem do soro .....	15
9- Teste imunoenzimático - ELISA INDIRETO .....	15
9.1- Sensibilização das microplacas .....	15
9.2- Bloqueio .....	15
9.3- Amostras de soros .....	15
9.4- Conjugado imunoenzimático .....	16
9.5- Substrato enzimático .....	16
10- Análise estatística .....	16
RESULTADOS .....	17
1- Teste de catatonia .....	17
2- Teste imunoenzimático - ELISA INDIRETO .....	17
3- Porcentagem de sobrevivência .....	18
4- Quadro clínico dos animais .....	19
5- Peso .....	19
DISCUSSÃO .....	31
CONCLUSÕES .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

## INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos está havendo uma rápida expansão das pesquisas que enfocam as relações existentes entre a imunidade, o comportamento e o sistema neural. Embora as pesquisas em psiconeuroimunologia sejam relativamente novas, existem informações resultantes de observação clínica e experimental sugerindo que a função imune pode ser alterada por processos psicológicos e, também, dados provocativos sugerindo que estados afetivos e características de personalidade estão associados com diferenças na função imunológica. Uma visão tradicional de que a função imune está limitada a interações celulares ocorrendo dentro dos tecidos linfóides é insuficiente para explicar mudanças na imunidade observadas não apenas no homem, mas também, em condições de laboratório com animais de experimentação. Existem novas razões que compelem a se acreditar que o processo imunorregulatório *in vivo* influencia e é influenciado pelas condições dinâmicas do sistema neuroendócrino. Assim sendo, o sistema imunológico comporta-se como um elemento especial dos sistemas homeostáticos, alvo da interferência neuroendócrina, ativado em condições importantes de quebra da homeostasia, como, por exemplo, numa infecção. O sistema imune parece ser modulado não somente por mecanismos de realimentação mediados através de processos endócrinos e neurais, mas também por mecanismos de alimentação a partir de informações que são vivenciadas, aprendidas e interferentes no mecanismo imunológico. (ADER *et al*, 1990).

Vários estudos envolvendo condicionamento, estresse, fatores psicossociais e relações neuroanatômicas têm evidenciado alguns mecanismos da interação neuroimune (MADDEN, FELTEN, 1995)

Condições ambientais e fatores psicossociais, tais como multidão, barulho, separação maternal precoce e aspectos da manipulação de grupos animais podem influenciar a imunidade. Em humanos, mudanças em várias medidas da função imune têm sido relatados após eventos estressantes da vida, como morte de uma esposa, depressão e nível de estresse em estudantes de medicina durante a época de exames (MADDEN, FELTEN, 1995).

Todas as evidências até agora acumuladas sugerem que duas vias principais estão envolvidas nos mecanismos imunomodulatórios, a via neural e a via endócrina.

A participação do sistema neural tem sido demonstrada, pelo menos do ponto de vista anatômico, através do qual nervos autonômicos que terminam nos órgãos linfóides com a subsequente liberação de mediadores químicos que podem alterar localmente a função dos linfócitos. Em ratos, a inervação noradrenérgica provém do gânglio celiaco mesentérico e entra no baço ao lado da artéria esplênica onde as terminações nervosas chegam em áreas ricas em linfócitos T. Além disso, há uma via indireta de atuação, a neuro-humoral. A participação dessa via tem sido reforçada pela observação de que vários receptores, até agora entendidos como específicos de membranas neuronais, têm sido localizados em membranas de linfócitos e outras células imunologicamente ativas. Isso possibilita que substâncias liberadas a partir do sistema neural, como os peptídeos encefalinas e endorfinas, possam ligar-se aos linfócitos resultando em aumento ou supressão de sua função. O sentido positivo ou negativo da modulação depende das concentrações de tais neuropeptídeos, da população de células utilizadas e das espécies estudadas (RABIM *et al*, 1989; MADDEN, FELTEN, 1995).

Pelo aspecto da via endócrina tem sido observado que vários hormônios da pituitária anterior e da glândula adrenal são imunomodulatórios. Linfócitos e células acessórias apresentam receptores para tais hormônios. Produtos de tais células comunicam-se e modulam as respostas do sistema nervoso e endócrino, estabelecendo mecanismos de retroalimentação com este último (ADER *et al*, 1990).

Deve ser considerado ainda, uma via que representa uma possibilidade de ação conjunta dos sistemas neural e endócrino sobre o sistema imunológico. Esse caminho seria pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com a liberação de glicocorticoides e sua consequente modulação da função imune (RABIM *et al*, 1989; MADDEN, FELTEN, 1995).

Os sistemas nervoso e endócrino têm papéis bem estabelecidos na manutenção da homeostase sistêmica, entretanto a integridade dos tecidos individuais é mantida através da produção de uma variedade de mediadores celulares conhecidos como citocinas (HOPHINS, ROTHWELL, 1995). Muitas citocinas e seus receptores estão largamente distribuídos

nossistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP); sua expressão é influenciada pelas mudanças na homeostase tecidual. Elas exercem diversas ações nos SNC e SNP e estão implicadas em resposta a doenças e injúrias. Certas citocinas participam no controle da resposta sistêmica do hospedeiro contra doenças, atuando como sinalizadoras para o cérebro e dentro do mesmo. Estas moléculas estão também envolvidas na degeneração neuronal e reparos no SNC e SNP e têm sido propostas como mediadoras de várias neuropatologias (ROTHWELL, HOPKINS, 1995).

Um estudo recente em cultura de células de micróglia humana, sugere que citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6), juntamente com a micróglia, participam na defesa neurológica contra *T. gondii* (CHAO *et al*, 1994).

O *T. gondii* é um parasita que tem tropismo para várias células do organismo, incluindo as do SNC. Sua afinidade maior é para as células do sistema fagocítico mononuclear, para os leucócitos e para as células parenquimatosas (REY, 1991). É um parasita intracelular obrigatório com larga distribuição pelo mundo (OKAY, 1994); pertence ao filo Apicomplexa, à classe Sporozoa e à família Sarcocystidae, sendo portanto um esporozoário e muito próximo, morfologicamente, dos coccídios e dos plamódios (REY, 1991). Seu núcleo situa-se no meio do corpo ou próximo à extremidade posterior, sua forma é esférica ou alongada, e seu aspecto vesiculoso. Por vezes, o parasito apresenta-se oval, em vez de arqueado, o que parece indicar o início de uma divisão celular (REY, 1991). Os representantes do filo Apicomplexa possuem como principal característica em comum, a presença de uma modificação na extremidade anterior chamada de complexo apical, formada de organelas exocitáveis, importantes nos mecanismos de reconhecimento e invasão da célula hospedeira (MORRISSETE *et al*, 1994 apud MINELLI, 1995). Os passos morfológicos envolvidos na adesão e invasão da célula pelo *T. gondii* foram descritos há mais de 30 anos. A invasão tende a envolver a motilidade da superfície do parasita e a exocitose de organelas específicas localizadas no complexo apical. Entretanto, o mecanismo deste processo e as moléculas envolvidas são pouco conhecidos. O processo inteiro de invasão é feito em menos de 10 segundos e ocorre a partir de uma cascata complexa de eventos individuais (JOINER, DUBREMETZ, 1993).

Uma das questões mais enigmáticas durante o processo de invasão diz respeito à origem e à composição da membrana do vacúolo parasitóforo (VP). Análises microscópicas por criofatura indicam que a membrana do vacúolo parasitóforo pode ser representada essencialmente por uma bicamada fosfolipídica. Entretanto, não se sabe se os lipídeos

necessários para iniciar formação da membrana do VP são derivados do parasita ou do hospedeiro (JOINER, DUBREMETZ, 1993).

Uma vez interiorizados e protegidos dentro do vacúolo parasitóforo, os taquizoítas iniciam um processo de reprodução assexuada conhecido como endogenia (ou endodiogenia) - uma espécie de brotamento onde duas estruturas membranosas na parte anterior do núcleo do parasita-mãe iniciam a formação e envolvimento dos dois conóides nascentes. O núcleo assume a forma ferradura crescendo em direção aos conóides até ficarem independentes, envolvidos por estruturas membranosas que também abrigam organelas-filhas. O parasita mãe degenera, libera os toxoplasmas-filhos que formam o pseudocisto, e isso é a célula hospedeira rica em taquizoítas. O pseudocisto cresce à medida que os toxoplasmas se reproduzem, até romper a célula hospedeira, liberando taquizoítas prontos para invadirem novas células (MINELLI, 1995).

As principais formas evolutivas que o parasita apresenta durante o seu ciclo biológico são:

1 - Taquizoíta: forma de multiplicação rápida, presente em infecções agudas. Classicamente é descrito como tendo o aspecto de meia lua, apresenta-se ovóide ou piriforme, com uma extremidade arredondada e outra ligeiramente afilada.

2 - Cisto: forma de resistência no organismo. O protozoário agredido pelos mecanismos imunológicos, defende-se elaborando membrana espessa e, dentro desse reservatório, multiplica-se e forma um cisto com centenas de parasitas no interior. Os cistos são mais numerosos na fase crônica da infecção.

3 - Bradizoíta: forma de multiplicação lenta, presente no interior do cisto.

4 -Oocistos: forma infectante, formada por dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada um (AMATO NETO e ., 1982).

O ciclo biológico do *Toxoplasma* caracteriza-se por apresentar no seu ciclo vital uma fase extra-intestinal, com reprodução assexuada, em mamíferos e aves; e outra enteroepitelial, com reprodução sexuada (PESSÔA, MARTINS, 1982), em espécies dos gêneros *Felis* e *Lynx* - mas particularmente os gatos - que são os únicos hospedeiros nos quais o parasita pode completar o seu ciclo vital (REY, 1991).

O ciclo de vida sexual do parasita é definido pela formação de oocistos e esporozoítas no hospedeiro felino. Este ciclo começa com a ingestão de cistos teciduais de bradizoítas e culmina, após vários estágios intermediários, com a produção de micro e macrogametas. O microgameta é flagelado, permitindo ao parasita ir ao encontro do macrogameta. A fusão dos

gametas produz um zigoto, que se envolve em uma membrana cística rígida e é secretado como um oocisto não esporulado. Durante a infecção aguda, um gato pode excretar até 100 milhões de parasitas por dia. Depois de dois a três dias de exposição ao ar, à temperatura ambiente, os oocistos não infecciosos esporulam para produzir oito progênies de esporozoítas. Estes próprios oocistos estáveis são agora altamente infecciosos e podem permanecer viáveis por muitos anos no solo. Eles podem ser ingeridos por um hospedeiro intermediário, tal como as pessoas que manipulam latas de lixo ou um porco fuçando no quintal ou, talvez, um camundongo. Uma vez digeridos, os esporozoítos liberados infectam o epitélio intestinal, produzindo rápido crescimento dos taquizoítas assexuados e finalmente, bradizoítas. Isto completa o ciclo enteroepitelial do *T. gondii* (KASPER, BOOTHROYD, 1993).

No ciclo extra-intestinal de hospedeiros intermediários, o *T. gondii* entra na célula hospedeira e começa sua divisão por endogenia, um processo semelhante a fissão binária dentro de um vacúolo parasitóforo. O tempo de divisão é usualmente de 6 a 8 horas para a cepa virulenta RH. Quando o número de parasitas dentro da célula aproxima-se de 64-128 (em cultura de tecidos), as células se rompem, liberando taquizoítas que infectam as células adjacentes. Desta maneira, uma cultura infectada ou órgão logo mostram evidências de um processo citopatológico. A maioria dos taquizoítas é eliminada pelas respostas imunes humorais e mediadas por células. De sete a dez dias após a infecção sistêmica pelo taquizoíta, cistos teciduais que contêm bradizoítas se desenvolvem. Estes cistos teciduais ocorrem em uma variedade de órgãos do hospedeiro, mas principalmente no sistema nervoso central e músculo. Quando os cistos são ingeridos (isto é, quando o ser humano come carnes mal-cozidas), a membrana cística sofre rápida digestão na presença de pH ácido das secreções gástricas. Em hospedeiros não-felinos, tais como aves e mamíferos, os bradizoítas entram no epitélio do intestino delgado e transformam-se em taquizoítas, dividindo-se rapidamente. Esta infecção sistêmica aguda pelo taquizoíta é seguida pela formação de cistos crônicos de bradizoítas, usualmente detectáveis de 10 a 14 horas após a infecção aguda. Uma vez que cistos contendo bradizoítas são formados, o ciclo não-felino é completado (KASPER, BOOTHROYD, 1993). Centenas ou milhares de formas císticas do bradizoíta são encontradas em tecidos, nos quais podem persistir por toda a vida do hospedeiro (OKAY, 1994). O bradizoíta é a fonte presumível da reativação da infecção no indivíduo imunodeprimido, sendo pouco entendida a transformação de taquizoíta para bradizoíta (KASPER, BOOTHROYD, 1993). O entendimento dos fatores que promovem a interconversão bradizoíta-taquizoíta, permitiriam a manipulação da conversão através de cada estágio e ajudaria no controle da reativação.

toxoplásrica *in vivo* (SOETE *et al.*, 1993). Atualmente há um número crescente de informações a respeito da estrutura antigênica dos taquizoítas (TOMAVO, 1991), enquanto pouco se sabe sobre a estrutura antigênica de cistos teciduais (WOODISON, 1990).

O *T. gondii* é o agente da toxoplasmose, uma zoonose que afeta grande parte da população humana sob a forma de infecção crônica assintomática. No entanto, é capaz de determinar nos indivíduos adultos um quadro agudo febril, com linfoadenopatia e, nas crianças, uma forma subaguda de encefalomielite e coriorretinite. A forma congênita é particularmente grave. Camundongos inoculados experimentalmente com *T. gondii* apresentam um quadro de meningencefalomielite aguda e peritonite; enquanto ratos apresentam apenas um surto febril transitório, se a inoculação for cutânea. O primeiro caso de toxoplasmose humana foi descrito na Tchecoslováquia por Janku (1923); e no Brasil por Magarinos Torres em 1927 (REY, 1991).

A importância da toxoplasmose decorre de vários fatores, como veremos a seguir. Em primeiro lugar, constitui uma infecção cosmopolita e está muito difundida, 15% a 68% da população adulta norte-americana tem sorologia positiva para anticorpos de *T. gondii* (REY, 1991). Segundo, ataca fetos e crianças pequenas, sendo que a infecção pelo *Toxoplasma* em fetos humanos está associada com vários defeitos congênitos quando a infecção primária é adquirida no primeiro trimestre de gravidez. Somente nos EUA existem vários milhares de recém-natos a cada ano com toxoplasmose congênita. Anualmente, os custos de saúde para estes indivíduos com sequelas neurológicas da infecção congênita, tem sido estimados em várias centenas de dólares. Terceiro, constitui uma infecção oportunista, onde os indivíduos de alto risco são aquelas pessoas imunodeprimidas que desenvolvem meningoencefalite toxoplásrica fatal. Predominantemente, o mais frequente grupo entre estes indivíduos são aqueles com AIDS. O índice de incidência por infecção naqueles indivíduos está entre 5% e 33% (KASPER, BOOTHROYD, 1993).

Contrastando com a infecção de indivíduos normais, a toxoplasmose é extremamente grave em pacientes com imunodepressão de etiologias diversas. Infecções crônicas e assintomáticas assumem subitamente caráter de reativação, onde agora bradizoítas convertem-se em taquizoítas. Com o advento da AIDS, a partir dos anos oitenta, a toxoplasmose passa a ocupar um lugar de destaque como causa de óbito por infecções oportunistas, nesses pacientes (REY, 1991).

Na maioria dos casos desenvolve-se um quadro clínico de encefalite aguda, que mata o aidético em poucos dias, caso não seja tratado. Outras vezes a evolução é

prolongada.. Os aidéticos que desenvolvem encefalite toxoplásmtica já tem, em geral, o diagnóstico da AIDS; porém em alguns casos, a encefalite é a primeira manifestação clínica de uma imunodepressão (REY, 1991).

A imunidade mediada por células tem sido demonstrada ser um importante mecanismo na regulação da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em camundongos e na espécie humana (KASPER, BOOTHROYD, 1993). Células T CD4+ e CD8+, macrófagos e células NK desempenham papéis críticos na imunidade celular na infecção pelo *T. gondii*. O papel das citocinas secretadas por estas células do sistema imune tem sido investigada intensamente nos últimos anos (HUNTER, REMINGTON, 1994). O *Toxoplasma gondii* induz a síntese de uma variedade de citocinas no hospedeiro infectado. Estas citocinas desempenham um papel crítico na proteção deste hospedeiro contra a infecção e alterações nos níveis de secreção destes produtos podem resultar num estado de susceptibilidade aumentada contra este protozoário (KASPER, BOOTHROYD, 1993).

A resposta imune protetora desenvolvida durante a infecção por *T. gondii* e o tipo de célula T "helper" a ser expandido são certamente influenciadas pelas citocinas presentes no microambiente durante o processo de diferenciação celular. Citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-12, entre outras, podem dirigir a diferenciação de subpopulações de células T com consequente ativação preferencial de células Th1 ou Th2. Estas subpopulações de linfócitos T foram definidas com base em seu padrão de secreção de citocinas (MOSMANN *et al*, 1986). Th1 secreta IL-2 e IFN- $\gamma$  induzindo preferencialmente a ativação de macrófagos e a resposta mediada por células (STOUT, BOTTOMLY, 1989, MOORE *et al*, 1990) enquanto Th2 secreta IL-4, IL-5 e IL-10 fornecendo maior ajuda para a resposta mediada por anticorpos (BOOM *et al*, 1988). O IFN- $\gamma$  inibe a proliferação de células Th2 e IL-4 inibe a expressão do receptor de IL-2 e a produção de IFN- $\gamma$  (PELEMAN *et al*, 1989). Quanto a IL-10, tem sido demonstrado que esta inibe a síntese de citocinas por Th1 (MOORE *et al*, 1990), cujo efeito é dependente da presença de células acessórias (FIORENTINO *et al*, 1991). O balanço entre estas citocinas (quantidade, momento durante a resposta imune em que são produzidas, inibidores e a própria presença do parasita) determina o padrão de resposta imune, ditando as classes de anticorpos a serem produzidas e a resposta celular eferente a ser gerada.

Na infecção por *T. gondii*, o papel das citocinas no determinismo de resistência ou susceptibilidade ainda não é completamente entendido. IFN- $\gamma$  tem sido mais estreitamente associado à resistência do hospedeiro. A administração de anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  resulta em mortalidade de animais infectados com cepas avirulentas do parasita, as quais são

incapazes de provocar morte nos animais controles. Ainda, a neutralização de IFN- $\gamma$  em animais cronicamente infectados resulta num aumento e maior severidade de encefalite (HUNTER, REMINGTON, 1994). Por outro lado, a administração de IFN- $\gamma$  recombinante aumenta a sobrevivência, retarda a mortalidade de animais susceptíveis e diminui a severidade de encefalite (SUZUKI *et al.*, 1990). A atividade protetora de IFN- $\gamma$  tem sido associada com sua habilidade de ativar macrófagos residentes a matar e inibir a replicação intracelular dos parasitas. Como em outras protozooses, a presença de TNF- $\alpha$  é fundamental para disparar a produção de radicais intermediários do nitrogênio (RNI) em macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$  (SIBLEY *et al.*, 1991, SILVA *et al.*, 1995). Anticorpos anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IFN- $\gamma$  bloqueiam completamente a atividade microbicida dos macrófagos (SILVA *et al.*, 1995).

Numa tentativa de entender o papel das citocinas no determinismo da infecção por *T. gondii*, nos últimos anos tem sido dado ênfase a citocinas secretadas antes do aparecimento da imunidade específica nos animais. Entre estas, a IL-12 tem merecido especial destaque. Esta foi originalmente identificada devido ao seu efeito estimulatório em células NK e células T citotóxicas. Em adição, a produção de IFN- $\gamma$  por células NK é aumentada por IL-12 e também é um fator essencial para a diferenciação de linfócitos Th1 (KENNEDY *et al.*, 1994). Estas propriedades conferem a esta citocina um importante papel na imunidade natural a diferentes patógenos como *Listeria monocitogenes*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* (HUNTER, REMINGTON, 1994, GAZZINELLI *et al.*, 1993, CARDILLO *et al.*, 1995). Estes parasitas têm a capacidade de estimular macrófagos a produzirem IL-12 e TNF- $\alpha$  que, sinergicamente, podem induzir células NK a produzir IFN- $\gamma$  e, consequentemente, promover a ativação de macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1993). Experimentos com esplenócitos de camundongos SCID revelaram que macrófagos produzem IL-12 e TNF- $\alpha$  em resposta a taquizoítas ou antígenos de *T. gondii* que, por sua vez, ativam células NK a produzirem IFN- $\gamma$  (GAZZINELLI *et al.*, 1993). Outros experimentos mostraram que a administração exógena de IL-12 a camundongos BALB/c infectados com uma cepa virulenta de *T. gondii* consideravelmente retarda o tempo de morte destes animais (KHAN, *et al.*, 1994). Ao contrário, a administração de anticorpo neutralizante anti-IL-12 resultou em aumento de mortalidade (HUNTER, REMINGTON, 1994).

Outra citocina que poderia desempenhar papel importante no determinismo da susceptibilidade ao *Toxoplasma gondii* é a IL-10. Esta, além de inibir a atividade microbicida de macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$  (SILVA *et al.*, 1992), tem efeitos inibitórios sobre a diferenciação de clones Th1 e produção de IFN- $\gamma$  por células NK (natural killer) e células T e é

capaz de inibir a produção de IL-12 por células acessórias (KENNEDY *et al.*, 1994). A atuação destas diversas citocinas durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* pode determinar ativação ou não dos macrófagos que resultará em maior ou menor atividade microbicida. Por outro lado, a produção de radicais intermediários do nitrogênio (RNI) por estas células podem desempenhar importante papel na imunossupressão verificada durante a infecção aguda por este parasita (CANDOLFI *et al.*, 1994).

Um modelo experimental classicamente descrito na literatura é a indução da imunodepressão da imunidade celular pelo tratamento com ciclofosfamida. Esta droga é um agente alquilante, que tem a propriedade de interferir nos mecanismos fundamentais relacionados ao crescimento celular, atividade mitótica, diferenciação e funcionamento. A capacidade de interferir na mitose normal e na divisão celular em todos tecidos de rápida proliferação, fornece a base de suas aplicações terapêuticas e de muitas de suas propriedades tóxicas. É usada como antiblástico no tratamento de linfomas, leucemias, câncer de mama, pulmão e outras neoplasias; e dentre as suas reações adversas incluem-se alopecia, fibrose intersticial pulmonar, depressão medular, ação teratogênica e surgimento de neoplasias secundárias. Em virtude de suas potentes propriedades imunossupressoras, a ciclofosfamida é o agente primário utilizado para ablação dos elementos linfoides nos pacientes que vão receber transplantes de medula óssea (CALABRESI, CHABNER, 1991).

Sabe-se que ambientes estressantes e situações psicológicas adversas resultam em morbidade e mortalidade aumentadas frente a desafios como tumores e doenças infecciosas. Associa-se o fato de que os níveis de anticorpos e a atividade de células NK encontram-se geralmente diminuídos frente a estressores (MADDEN, FELTEN, 1995). Tais observações sugerem que o sistema límbico possa estar direta ou indiretamente relacionado aos mecanismos imunológicos. Em recente estudo, NATAL e colaboradores (1995) sugeriram uma correlação entre o sistema dopaminérgico central e a resposta imune humoral na infecção aguda pelo *T. gondii*. Os níveis de anticorpos anti-*T. gondii* foram mais baixos em animais que receberam um bloqueador dopaminérgico. Apesar disso, nenhum animal mostrou qualquer sinal da toxoplasmose-doença, mesmo 30 dias após a inoculação.

Entre os bloqueadores dopaminérgicos mais utilizados estão as butirofenonas, entre as quais, o haloperidol. Esta droga é um neuroléptico, uma classe de agentes antipsicóticos, usados no tratamento de psicoses, psicoses orgânicas da fase maníaca da doença maníaco-depressiva e outras doenças idiopáticas agudas (BALDESSARINI, 1991). É particularmente eficaz contra os sintomas produtivos das psicoses, notadamente os delírios e as alucinações.

Ele exerce também uma ação sedativa em condições de excitação psicomotora. Trata-se de um neuroléptico de ação prolongada, uma vez que é gradativamente liberado no tecido muscular. Tal liberação se faz de forma progressiva, permitindo a obtenção de curvas plasmáticas uniformes, sem ocorrência de picos irregulares. A administração de dose única adequada produz efeito terapêutico estável que permanece durante quatro semanas em humanos (DICIONÁRIO..., 1993). Em doses elevadas, a maioria dos neurolépticos induz imobilidade cataléptica típica. O tônus muscular aumenta e é típico o achado de ptose. Em relação a animais, estes parecem indiferentes à maioria dos estímulos, embora continuem a afastar-se daqueles que são nocivos ou dolorosos. A imobilidade cataléptica dos animais tratados com neurolépticos, lembra a catatonia de alguns pacientes psicóticos e de vários distúrbios metabólicos e neurológicos que afetam o sistema nervoso central (BALDESSARINI, 1991).

A análise da interrelação entre os fatores que conferem resistência no rato à infecção pelo *Toxoplasma gondii* e os fatores do sistema neural que participam da modulação da resposta imune do hospedeiro pode levar a um melhor entendimento da fisiopatogenia da toxoplasmose nas suas diferentes formas clínicas.

## OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral estudar o envolvimento de estruturas neurais com o desenvolvimento de resposta imune protetora em ratos experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*.

Os objetivos específicos consistiram em observar as variações nos níveis de anticorpos anti-*T. gondii* em animais tratados com haloperidol e / ou ciclofosfamida, bem como verificar possíveis modificações nas taxas de mortalidade e de peso corporal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1- MANUTENÇÃO DOS PARASITAS

A cepa RH de *T. gondii*, isolada por Sabin e Feldman (1948), foi originalmente cedida pelo Prof. Mário Camargo, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Taquizoítas da cepa RH foram mantidos, em laboratório, através de passagens intraperitoneais sucessivas, feitas 3 vezes por semana, inoculando-se 400 µl de exsudato em cada camundongo (MINEO, 1982).

### 2- ANIMAIS

#### 2.1- Animais utilizados para manutenção dos parasitas

Foram utilizados camundongos alógénicos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando em média 20 gramas, provenientes do Biotério do Instituto Vallée de Uberlândia. Os camundongos eram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunologia, em caixas plásticas forradas com serragem, com água e ração *ad libitum*.

#### 2.2- Animais utilizados nos experimentos

Foram utilizados 16 ratos (*Rattus norvegicus* - variedade albina) machos, provenientes do Biotério do Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Uberlândia (U.F.U.), pesando inicialmente 368 gramas em média. Os ratos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunologia, nas mesmas condições que os camundongos.

#### 2.3- Divisão dos grupos de animais

Os 16 ratos foram divididos em quatro grupos de quatro animais, sendo um grupo controle e três grupos experimentais. Estes animais foram distribuídos como se segue:

- Grupo 1: animais não-infectados, inoculados via intraperitoneal (i.p.) com meio de cultura M.E.M. (Minimum Essential Medium), sendo que dois ratos foram inoculados 13 meses antes do início das sangrias e dois, inoculados 11 meses antes.
- Grupo 2: animais infectados, inoculados intraperitonealmente com *T. gondii*, sendo que dois ratos foram infectados 13 meses antes do início das sangrias e dois, 11 meses antes.
- Grupo 3: animais infectados, inoculados i.p. com *T. gondii*, 9 meses antes do início das sangrias.
- Grupo 4: animais infectados, inoculados i.p. com *T. gondii*, 4 meses antes do início das sangrias.

### **3- PREPARAÇÃO DO INÓCULO**

O exsudato utilizado nos inóculos foi obtido através de lavagens da cavidade peritoneal de camundongos previamente infectados com 4 ml de suspensão de cloreto de sódio (0,15 M). As suspensões de parasitas foram analisadas ao microscópio óptico, descartando-se aquelas que apresentavam altas taxas de contaminação por células hospedeiras ou bactérias. Posteriormente, o exsudato foi centrifugado a 1000g por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo os parasitas ressuspensos em meio de cultura MEM, submetidos a duas outras centrifugações, no mesmo meio de cultura.

Para avaliar o número de toxoplasmas viáveis, 50 µl da suspensão de parasitas eram transferidos para um tubo de ensaio contendo igual volume de solução de Azul de Tripan 1%. Uma aliquote desta solução era contada em câmara de Neubauer, utilizando-se cinco quadrados da região central. Eram considerados viáveis os parasitas não corados pelo azul de tripan. Desta forma, obteve-se o número de parasitas por ml de suspensão. Utilizou-se uma concentração média de  $10^5$  parasitas/rato, que foi inoculada intraperitonealmente.

### **4- TRATAMENTO**

Todos os ratos foram previamente pesados, antes de serem administradas as drogas, e a dose/Kg foi calculada para cada animal.

Utilizou-se dois tipos de drogas - o decanoato de haloperidol (Haldol decanoato, Produfarma S.A., Buenos Aires) e a ciclofosfamida (Enduxan, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo).

dopaminérgico em dose de 100 mg/Kg, administrada por via intramuscular; enquanto que a ciclofosfamida (administrada intraperitonealmente) foi utilizada como agente imunossupressor em uma dose de 200 mg/Kg, segundo ensaio descrito por ALVAREZ *et al* (1991), com modificações.

Os animais dos 4 grupos foram tratados da seguinte maneira: no grupo 1, dois ratos receberam ciclofosfamida, enquanto dois, receberam decanoato de haloperidol; no grupo 2, todos os ratos receberam decanoato de haloperidol; no grupo 3, todos os ratos receberam ciclofosfamida; e no grupo 4, todos os ratos receberam, ao mesmo tempo, decanoato de haloperidol e ciclofosfamida.

A ciclofosfamida foi administrada nos dias: 0 (1<sup>a</sup> dose após a sangria prévia), 9º, 17º, 24º e 31º; enquanto que o decanoato de haloperidol foi administrado somente no dia 0.

## 5- PESAGEM DOS ANIMAIS

Foram feitas várias pesagens dos ratos para se avaliar o peso dos quatro grupos. Os ratos dos grupos 1 e 2 foram pesados em 0, 17º, 31º e 42º dia pós tratamento; enquanto que os grupos 3 e 4 foram pesados em 0, 9º, 17º, 24º e 31º dia pós- tratamento.

## 6- TESTE DE CATATONIA

Foi feito o teste de catatonia nos ratos que receberam decanoato de haloperidol, para avaliar se os animais estavam sob o efeito do mesmo. O teste consistiu em colocar as patas dianteiras do animal em uma superfície elevada; quando o animal já estava sob o efeito da droga, ele permanecia imóvel, na posição deixada, por alguns minutos.

O teste era feito periodicamente para se avaliar a manutenção do efeito bloqueador dopaminérgico do haloperidol.

Os ratos dos grupos que não receberam o decanoato de haloperidol também foram submetidos ao teste para efeito de comparação.

## 7- SANGRIA DOS ANIMAIS

Foram feitas sangrias através de punção do plexo vascular do ângulo medial da órbita, com capilares de microhematócrito. O sangue era coletado em tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml, deixado à temperatura ambiente por 12 horas, centrifugado a 5000g por 3 minutos à temperatura ambiente. Ao todo, foram coletadas 178 amostras de sangue em 16 sangrias, feitas em diferentes intervalos de tempo.

- 1<sup>a</sup> sangria (sangria prévia): feita antes do tratamento, no dia 0.
- 1<sup>a</sup> a 7<sup>a</sup> sangrias: feitas com intervalos de 2 em 2 dias, do dia 0 ao 14º dia.
- 7<sup>a</sup> a 15<sup>a</sup> sangrias: feitas com intervalos de 3 e 4 dias alternados sucessivamente, do 14º ao 42º dia.

## **8- ESTOCAGEM DO SORO**

Os soros obtidos da centrifugação foram armazenados em tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml, devidamente identificados e estocados a -20º C.

## **9- TESTE IMUNOENZIMÁTICO - ELISA INDIRETO**

Para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, foi utilizado ensaio imunoenzimático indireto, como descrito por MINEO (1980), com modificações.

### **9.1- Sensibilização das microplacas**

Foram utilizadas microplacas de poliestireno, com fundo em "U" (Hemobag - Campinas, S. P.), sensibilizadas com taquizoítas de *T. gondii*, obtidos como descrito anteriormente, tendo sido acertada a concentração de 10<sup>5</sup> taquizoítas/50 µl/poço. Foram incubadas a 37º C por 18-24 horas, e em seguida estocadas a -20°C em embalagens plásticas até o momento do uso.

### **9.2- Bloqueio**

As microplacas foram submetidas a três ciclos de lavagens com PBS e em seguida bloqueadas com solução PBS Tween 20 (PBS-T) a 0,05%, adicionado de leite desnatado a 5% (200 µl/poço), durante 30 minutos à temperatura ambiente.

### **9.3- Amostras de soros**

Todas as amostras de soros foram descongeladas simultaneamente para a realização do teste imunoenzimático.

Um total de 178 amostras de soros de ratos dos diferentes grupos, colhidas desde o dia 0 até o 42º dia pós-tratamento, foram adicionadas, em duplicata, às microplacas (50 µl/poço), na diluição de 1:32, utilizando-se como diluente PBS - T, acrescido de 10% de soro de soro de camundongo normal.

Soros de ratos infectados e não infectados foram utilizados como soros controles reativos e não reativos, respectivamente.

As placas foram incubadas por 45 minutos à 37°C, e em seguida, submetidas a três ciclos de lavagens de 5 minutos cada, com PBS - T.

#### **9.4- Conjugado imunoenzimático**

Foi adicionada 50 µl/poço de IgG de coelho anti -  $\gamma$ -globulina de rato, marcada com peroxidase (WILSON, NAKANE, 1978), na diluição de 1:1000, em PBS - T acrescido de leite desnatado a 1 %, por um período de incubação de 45 minutos a 37° C. Após a incubação, as placas foram submetidas a novos ciclos de lavagens com PBS - T.

#### **9.5- Substrato enzimático**

Adicionou-se o substrato enzimático - (solução de peróxido de hidrogênio a 0,03% em tampão cromógeno - 50 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 25 mM de ácido cítrico - pH 5,0, contendo 0,4 mg/ml de ortofenilenodiamina - OPD), incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 N e a reatividade foi avaliada pela determinação dos valores de absorbância a 492 nm, em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow, USA). Após a leitura, as microplacas foram fotografadas para se observar as diferenças entre soros reativos e não reativos.

O “cut-off” da reação foi determinado pela média dos valores de absorbância obtidos das amostras de soros de animais não-infectados.

### **10- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As médias dos valores de absorbância obtidos para as amostras de soros dos diferentes grupos foram comparadas duas a duas por meio de teste “t” de Student para amostras não-pareadas.

A comparação geral entre os valores médios de absorbância dos quatro grupos foi realizada por meio de análise de variância com dois fatores sem replicação.

## RESULTADOS

### 1- TESTE DE CATATONIA

Os animais dos grupos 1 e 2 que receberam decanoato de haloperidol apresentaram postura catatônica típica (Figura 1), enquanto que os animais dos grupos 3 e 4 que não receberam a referida droga, não apresentaram postura catatônica (Figura 2).

Os animais permaneceram catatônicos por um período de 54 dias após a injeção de decanoato de haloperidol, com exceção de um dos animais, que estava catatônico, mas morreu 24 dias após o tratamento.

### 2- TESTE IMUNOENZIMÁTICO - ELISA INDIRETO

Foi verificada, após a revelação da reação, uma nítida diferença entre os soros reativos e não reativos (Figura 3). Para efeito de corte entre as amostras reativas e não-reativas, estabeleceu-se o limiar de reatividade como a média das absorbâncias das amostras não-reativas acrescidas de três desvios-padrão (“cut-off” = 0,170).

Comparando-se os resultados da cinética de anticorpos anti-*T. gondii* determinada pelo teste imunoenzimático ELISA realizado em amostras de soros de ratos não infectados (Figura 4) e infectados (Figura 5), observa-se uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) nos níveis de anticorpos entre animais não infectados tratados com ciclofosfamida ou haloperidol e animais infectados tratados com haloperidol, sendo que os animais infectados apresentaram níveis de anticorpos acima do limiar de reatividade observado nas amostras de soros dos animais não-infectados (Figura 8).

Analisando-se os resultados da cinética de anticorpos anti-*T. gondii*, determinada pelo teste ELISA realizado em amostras de soros de animais infectados e tratados com ciclofosfamida (Figura 6) ou animais infectados e tratados com ciclofosfamida e haloperidol (Figura 7), verifica-se que embora os dois grupos apresentem altos níveis de anticorpos, há uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre eles, pois o grupo 4, que recebeu ciclofosfamida e haloperidol, apresenta níveis maiores de anticorpos do que o grupo 3, que recebeu apenas ciclofosfamida (Figura 8).

Quando são comparados os quatro grupos de animais (Figura 8), nota-se que, com exceção das amostras colhidas nos 8º, 12º e 14º dias, o grupo de animais não-infectados apresenta níveis de anticorpos anti-*T. gondii* abaixo do "cut-off", enquanto os grupos de animais infectados e tratados com haloperidol, ciclofosfamida ou haloperidol e ciclofosfamida, apresentaram sistematicamente, títulos maiores de anticorpos quando comparados entre si.

Tomadas em conjunto, as médias dos valores de absorbância, ao longo de todo o período de observação, para os animais não-infectados ( $\bar{X} = 0,169$ ) ou para os infectados e tratados com haloperidol ( $\bar{X} = 0,208$ ) ou ciclofosfamida ( $\bar{X} = 0,261$ ) ou haloperidol e ciclofosfamida ( $\bar{X} = 0,308$ ), foram diferentes estatisticamente ( $p = 0,0004$ ).

### **3- PESO**

Após o tratamento, foi observada certa variação de peso em todos os grupos de animais. Na determinação do peso médio dos animais não-infectados (NI) e infectados (I) com *T. gondii* (Figura 11), foi observado que os ratos do grupo 1(NI e tratados com haloperidol) tiveram uma certa tendência de ganho de peso, enquanto os ratos do grupo 2 (I e tratados com haloperidol) tiveram nos primeiros 17 dias de tratamento perda de peso, tendo recuperado o peso na segunda parte da observação, igualando-se aos animais do grupo 1. Nos ratos do grupos 3 (I e tratados com Ciclofosfamida) foi observado uma perda significativa de peso ( $p = 0,020$ ), enquanto que nos ratos do grupo 4 (I e tratados com haloperidol e ciclofosfamida) não houve perda significativa de peso.

### **4- QUADRO CLÍNICO DOS ANIMAIS**

Os animais do grupo tratado com ciclofosfamida e do grupo tratado com haloperidol e ciclofosfamida, apresentaram, pós-tratamento, alguns sinais marcantes, tais como: insuficiência

respiratória e alopecia, enquanto que os animais tratados com haloperidol apresentaram somente uma pequena perda de pêlos.

## 5- PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA

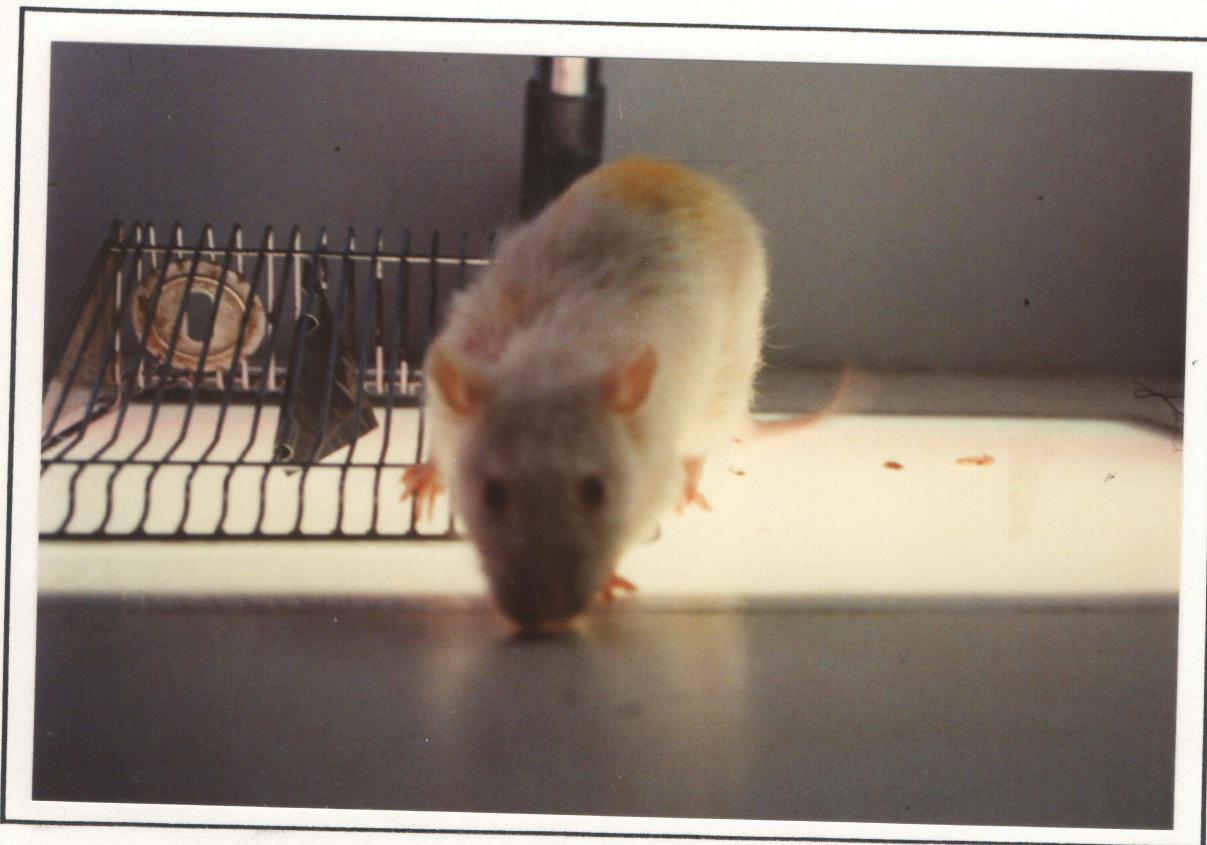
Antes do tratamento, todos os ratos apresentaram resistência à cepa RH, pois os animais permaneceram vivos por períodos variando de 4 meses a mais de um ano de infecção sem mostrar qualquer sinal da toxoplasmose-doença.

A porcentagem de sobrevivência de ratos não-infectados com *T. gondii* foi baixa nos animais tratados com ciclofosfamida, pois morreram 8 dias após o início do tratamento; enquanto que nos animais tratados com haloperidol a porcentagem de sobrevivência foi de 100% (Figura 9).

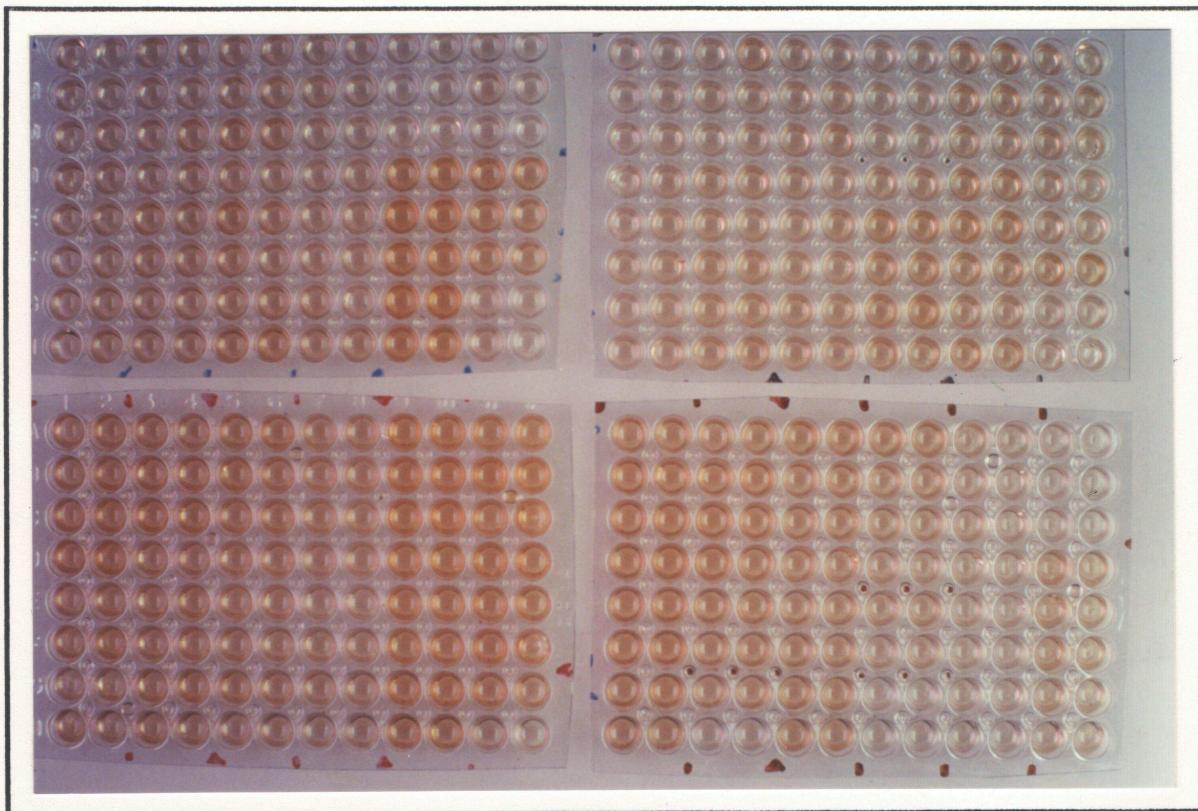
Nos ratos infectados com *T. gondii* e tratados com haloperidol, ciclofosfamida e ciclofosfamida + haloperidol, a determinação da porcentagem de sobrevivência variou nos 3 grupos (Figura 10); nos animais tratados com haloperidol a porcentagem de sobrevivência foi significativamente superior. Somente um dos animais, que apresentou-se com distúrbios posturais e locomotores após 24 dias de tratamento, foi perfundido com formaldeído, para obtenção do cérebro. Os animais que foram tratados com ciclofosfamida tiveram uma porcentagem de sobrevivência baixa, com um quadro clínico de emagrecimento e consequente morte natural. Um dos animais deste grupo foi perfundido com formaldeído para obtenção do cérebro, ao apresentar quadro clínico de insuficiência respiratória. Por outro lado, os animais que receberam haloperidol e ciclofosfamida, muito embora revelassem o mesmo quadro clínico, apresentaram uma porcentagem de sobrevivência mais baixa. Da mesma forma, neste grupo um dos animais foi sacrificado e o cérebro foi retirado ao apresentar quadro de intensa insuficiência respiratória.



**Figura 1** - Postura catatônica típica de um dos animais tratados com haloperidol.



**Figura 2** - Animal não tratado com haloperidol, sem postura catatônica.



**Figura 3** - Microplacas com soros reativos e não reativos, após a revelação da reação enzimática - ELISA indireto.

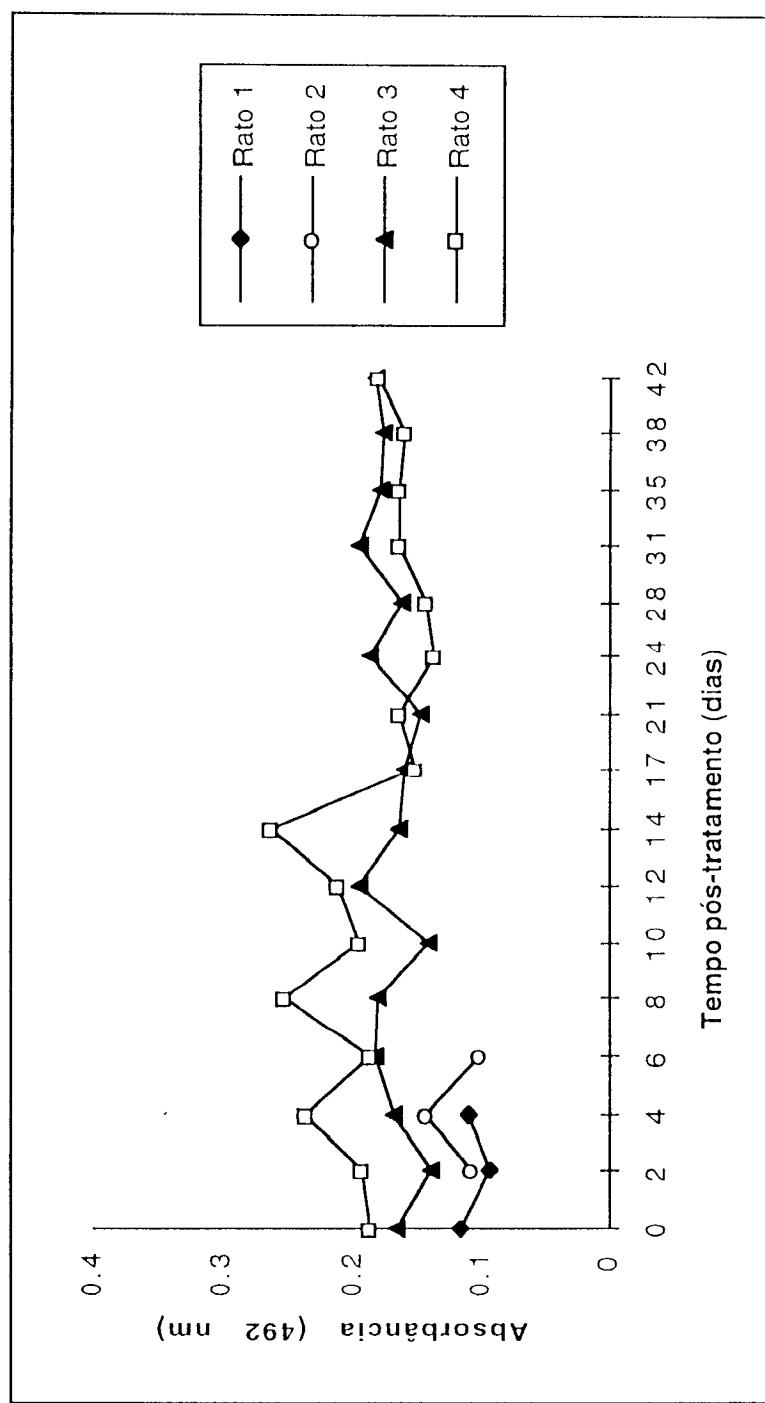


Figura 4. Resultados da cinética de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* determinada pelo teste imunoenzimático ELISA realizado em amostras de soros de ratos de ratos não-infectados e tratados com ciclofosfamida (ratos 1 e 2) ou haloperidol (ratos 3 e 4).

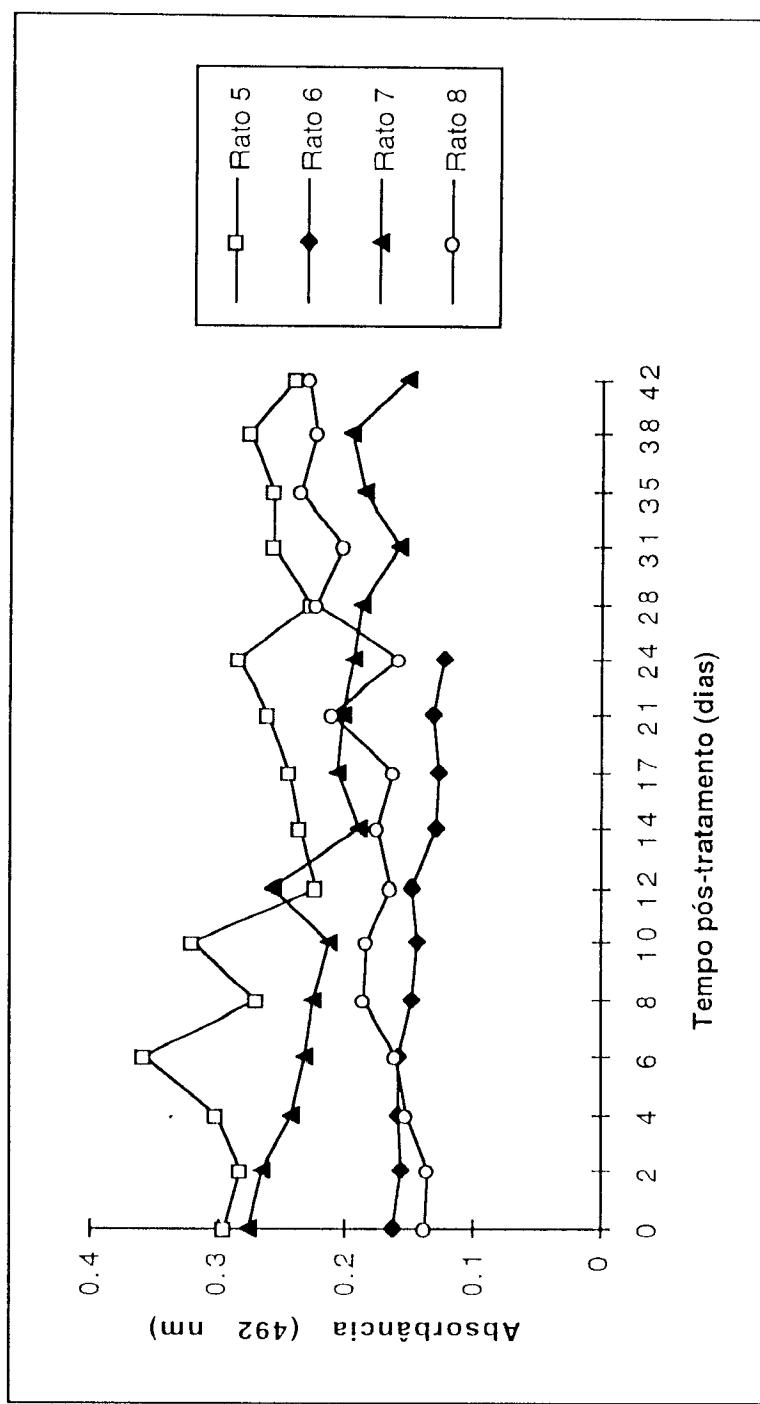


Figura 5. Resultados da cinética de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* determinada pelo teste imunoenzimático ELISA realizado em amostras de soros de ratos infectados e tratados com haloperídol.

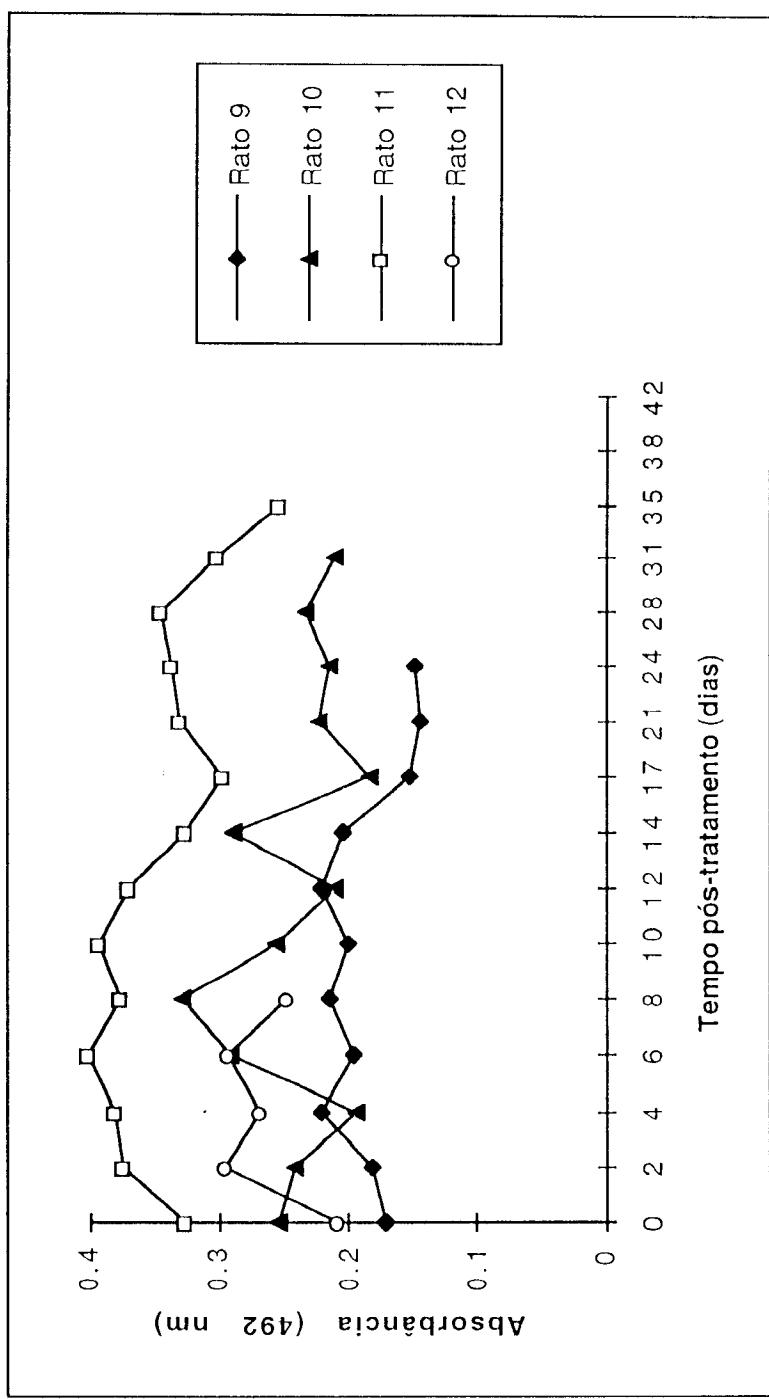


Figura 6. Resultados da cinética de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* determinada pelo teste imunoenzimático ELISA realizado em amostras de soros de ratos infectados e tratados com ciclofosfamida.

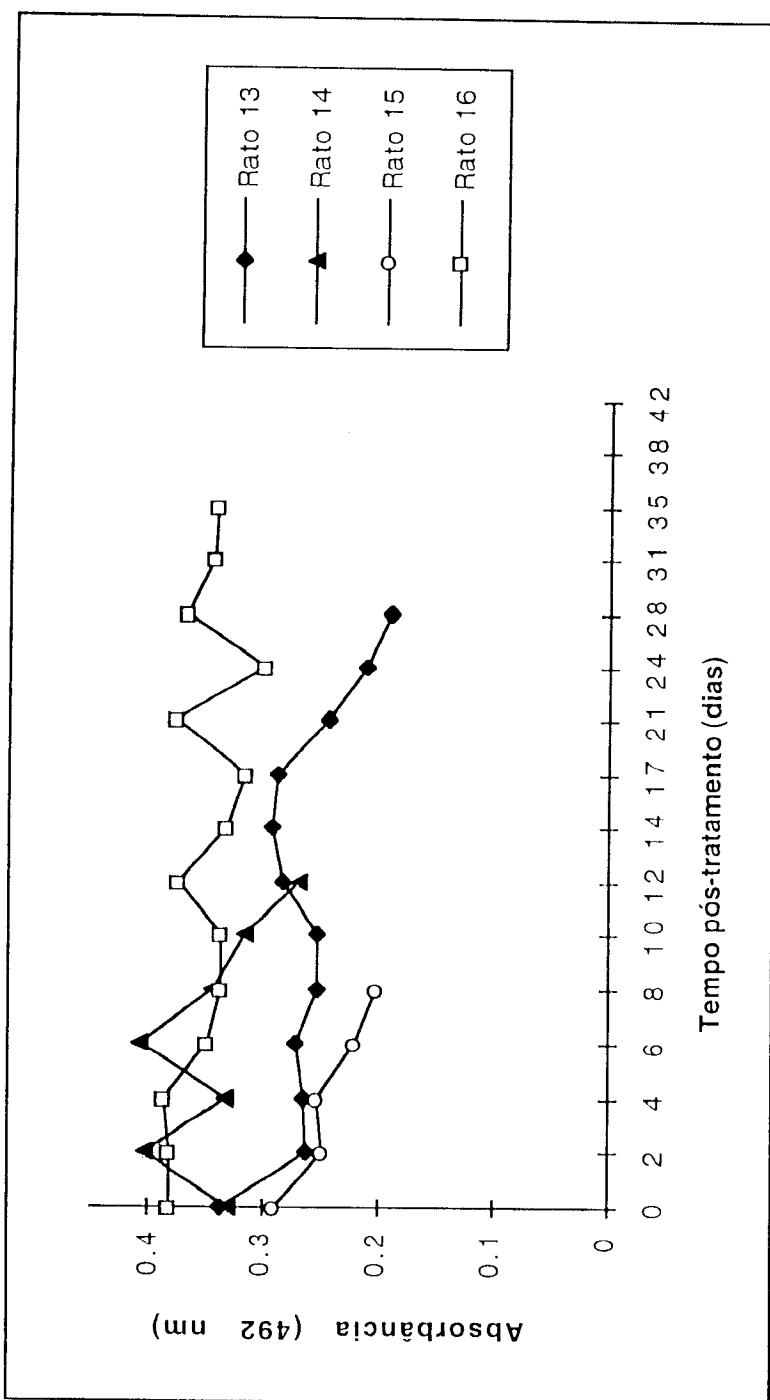


Figura 7. Resultados da cinética de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* determinada pelo teste imunoenzimático ELISA realizado em amostras de soros de ratos infectados e tratados simultaneamente com ciclofosfamida e haloperidol.

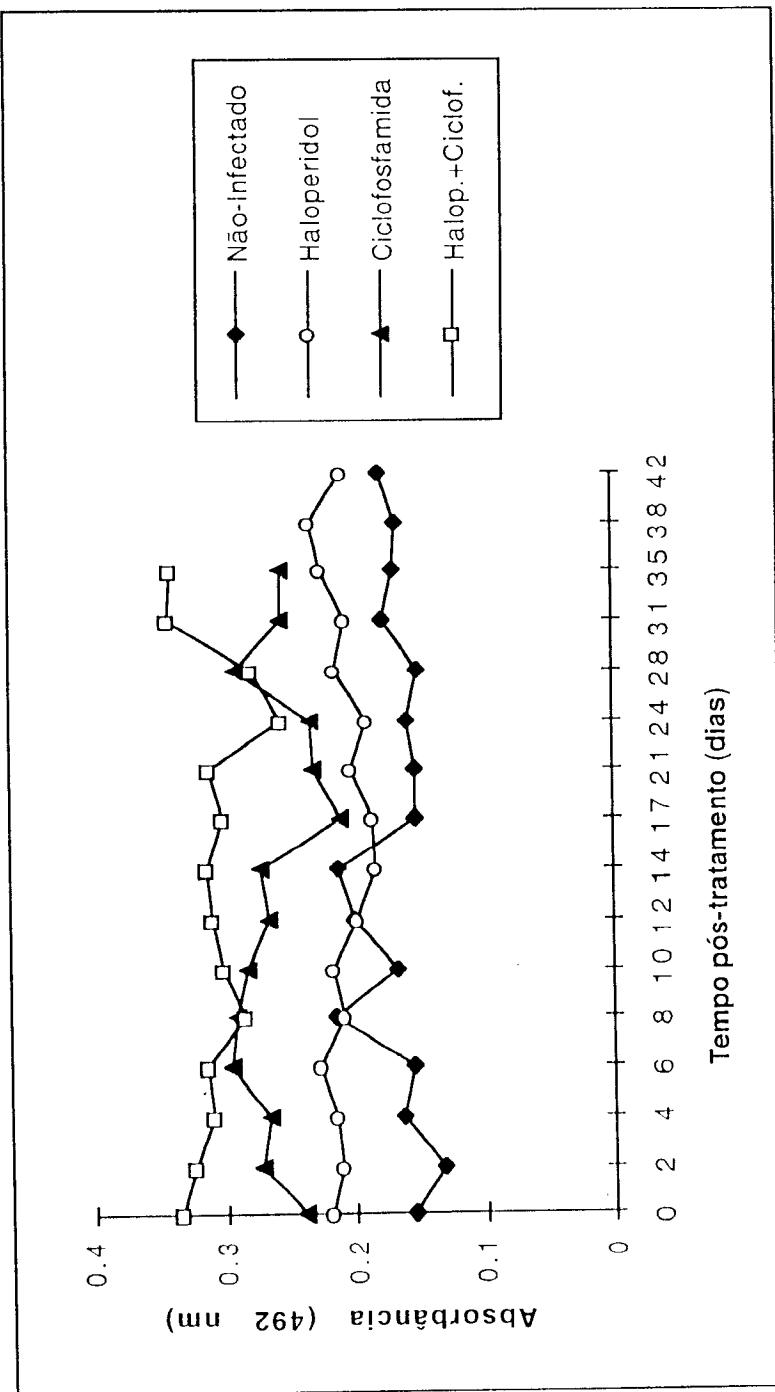
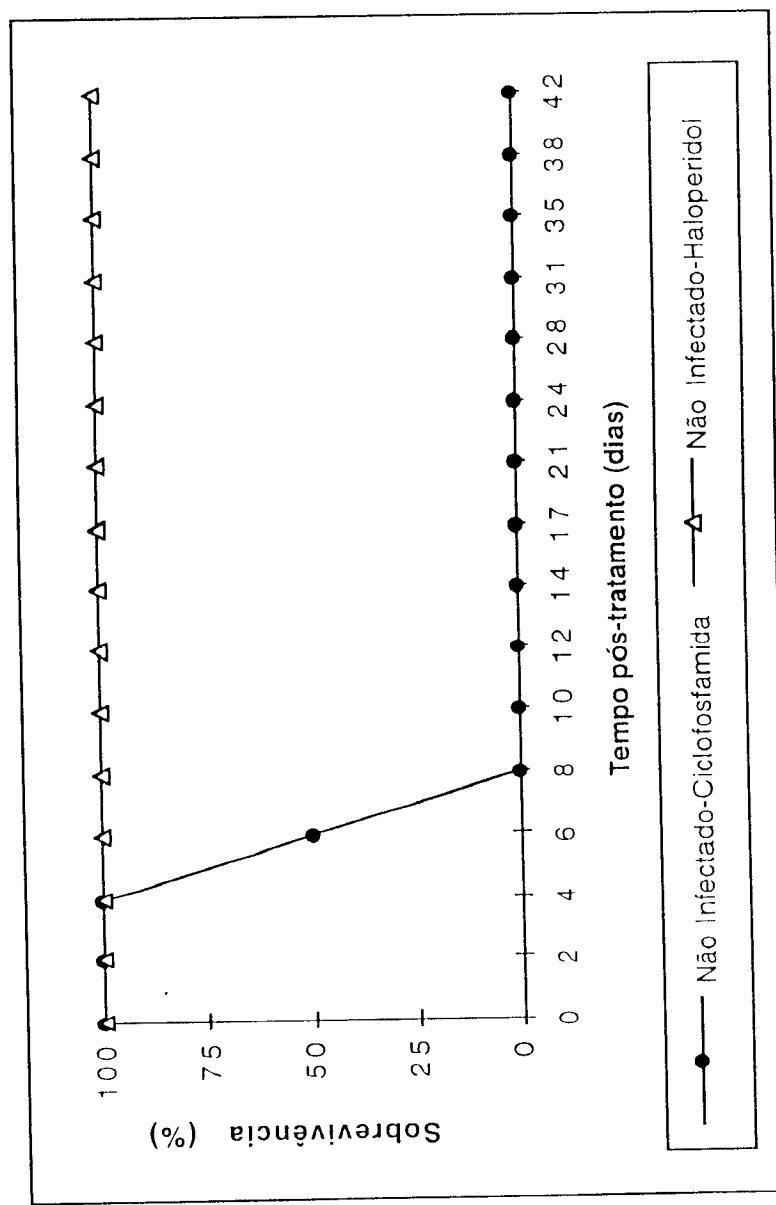


Figura 8. Resultados comparativos da cinética de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* determinada pelo teste imunoenzimático ELISA realizado entre amostras de soros de ratos não infectados e infectados que foram submetidos a tratamento com haloperidol ou ciclofosfamida ou haloperidol e ciclofosfamida.



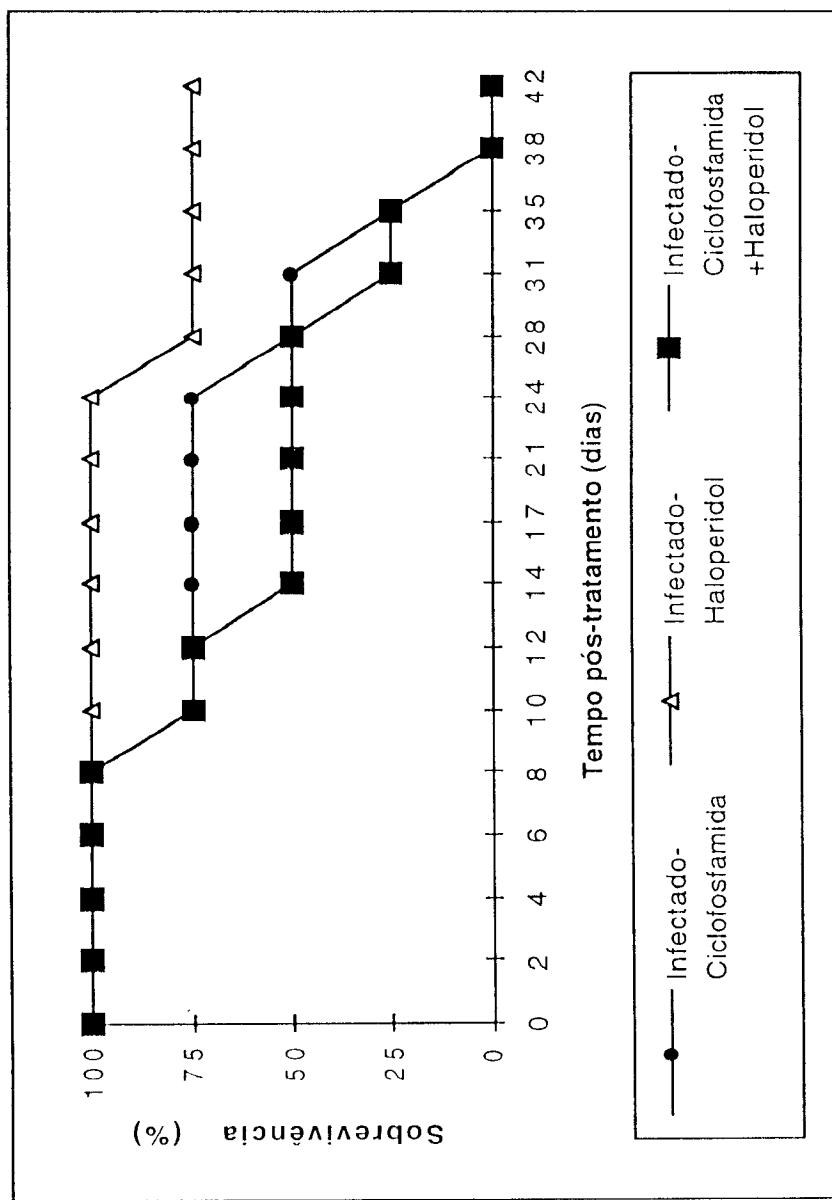


Figura 10. Determinação da porcentagem de sobrevivência de ratos infectados com *Toxoplasma gondii* e que foram subsequentemente tratados com ciclofosfamida e/ou haloperidol.

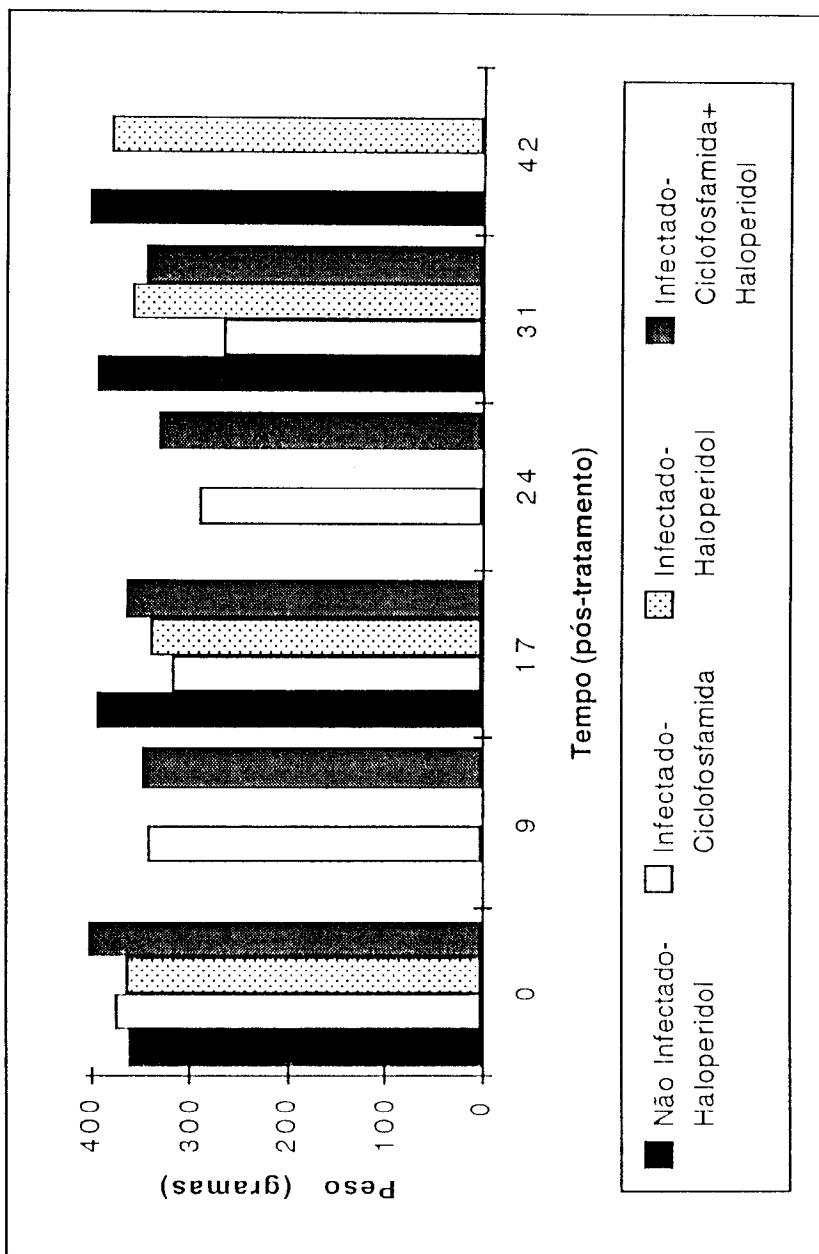


Figura 11. Determinação do peso médio dos ratos infectados ou não-infectados com *Toxoplasma gondii* e que foram subsequentemente tratados com ciclofosfamida e/ou haloperidol.

## DISCUSSÃO

Os animais que receberam haloperidol apresentaram catatonia, pois o haloperidol sendo um neuroléptico, quando administrado em dose elevada, induz à imobilidade cataléptica típica que permite que o paciente seja colocado em posturas anormais persistentes; a imobilidade cataléptica dos animais tratados com neurolépticos, lembra a catatonia de alguns pacientes psicóticos e de vários distúrbios metabólicos e neurológicos que afetam o sistema nervoso central (BALDESSARINI, 1991).

Em relação à cinética de anticorpos anti-*T. gondii* determinada pelo teste imunoenzimático ELISA nas diferentes amostras de soros dos quatro grupos de animais, observou-se que a diferença nos níveis de anticorpos entre os animais não-infectados do grupo 1 (tratados com haloperidol ou ciclofosfamida) e animais infectados do grupo 2 (tratados com haloperidol) é devida à presença de resposta imune específica ao parasita. Isto vem confirmar a especificidade do teste utilizado, como demonstrado em estudos anteriores em outras espécies (MINEO, 1980, MINEO, 1982).

Nos grupos de animais infectados tratados com ciclofosfamida ou ciclofosfamida e haloperidol, a diferença significativa dos níveis de anticorpos se deve ao fato de que o haloperidol potencializa o efeito da ciclofosfamida, sugerindo que a administração conjunta das duas drogas cause uma maior imunossupressão do que a administração da ciclofosfamida sozinha, depletando um maior número de células T. Sabe-se que a imunidade mediada por células é um importante mecanismo na regulação da infecção pelo *T. gondii*, juntamente com a variedade de citocinas produzidas, que desempenham um papel crítico na proteção do hospedeiro contra a infecção (KASPER, BOOTHROYD, 1993). Em consequência, foi observado no presente trabalho que a depleção de células T, causada pela imunossupressão nos animais, permitiu a reativação da doença, com a ruptura de cistos. Acredita-se que este

seja o principal fator causal da reativação da toxoplasmose em pacientes com AIDS (KASPER, BOOTHROYD, 1993). Foi observado também um aumento nos níveis de anticorpos anti-*T. gondii*. Isso tudo poderia sugerir que a utilização de um bloqueador dopaminérgico associado a drogas imunodepressoras potencializaria a ação destas, interferindo com a resposta humoral e celular. Em contraposição, o haloperidol administrado sozinho afeta o sistema humoral, porém, aparentemente não interfere na resposta celular, como observado por NATAL e colaboradores (1995), em ratos infectados na fase aguda.

A tendência de ganho de peso observado no grupo de animais não-infectados (grupo 1) e infectados (grupo 2), tratados com haloperidol foi devido ao aumento de apetite, consequente à administração do haloperidol (BALDESSARINI, 1991). A perda significativa de peso observada no grupo 3 (tratado com ciclofosfamida) pode ser considerada como uma das reações adversas do esquema de imunossupressão e a consequente reativação da infecção. No grupo 4 (tratado com ciclofosfamida e haloperidol), que perdeu menos peso que o grupo anterior, pode ter sido devido à administração conjunta das duas drogas, onde uma estimula o apetite e a outra talvez iniba.

A dificuldade respiratória e alopecia detectadas nos animais, principalmente naqueles que haviam recebido ciclofosfamida, podem ter sido originadas pelo efeito colateral da referida droga (CALABRESI, CHABNER, 1991).

A porcentagem de sobrevivência nos animais tratados com haloperidol foi maior do que nos animais tratados com ciclofosfamida e ciclofosfamida + haloperidol, pois a ciclofosfamida causa imunossupressão e promove a reativação da doença, causando a morte dos animais. Por outro lado, a porcentagem de sobrevivência mais baixa, observada nos animais que receberam haloperidol e ciclofosfamida, foi devida à uma maior taxa de reativação da doença, causada pela imunossupressão.

## CONCLUSÕES

Os nossos resultados demonstram que:

- A ciclofosfamida, como imunodepressor, leva a uma maior produção de anticorpos do que o haloperidol. A depressão da resposta imune celular afeta a resistência imunológica contra o parasita, com a consequente reativação da doença e morte dos animais.
- A utilização de uma droga bloqueadora das vias dopaminérgicas - haloperidol - potencializa a ação de uma droga depressora da imunidade celular, causa uma diminuição da resistência contra o parasita, aumenta ainda mais os níveis de anticorpos, levando a reativação da doença e consequente morte.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, R. et al. Interactions between the brain an the immune system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 30, p. 561-602, 1990.
- ALVAREZ, J. M. et al. Evolution of subpatent parasitaemia in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice with the help of a cyclophosphamide amplification tranfer assay. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 509-514, nov./dez. 1991.
- AMATO NETO, V. et al. **Toxoplasmose**. São Paulo: Sarvier, 1982. 159 p. (Monografias médicas: Série clínica médica, v. 10).
- BALDESSARINI, R. J. Fármacos e o tratamento de distúrbios psiquiátricos. In: GILMAN, A. G. et al. (Ed.) **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1232 p. p. 253-287.
- BOOM, W. H. et al. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocyte II. Effects of interleukin 4- and inerleukin 2- producing T cell clones on resting B lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 1352, 1988.
- CALABRESI, P., CHABNER, B. A. Fármacos antineoplásicos. In: GILMAN, A. G. et al. (Ed.) **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1232 p. p. 805-840.

- CANDOLFI, E. et al. Mitogen- and antigen- specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. **Infection and Immunity**, v. 62, 1995.
- CARDILLO, F. et al. Regulation of *T. cruzi* infection in mice by IFN- $\gamma$  and IL-10. The role of NK cells, 1995 (no prelo).
- CHAO, C. C. et al. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*-The role of cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 3, p. 1246-1252, 1994.
- DICIONÁRIO** de especialidades farmacêuticas. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1993. 785 p.
- FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 3815, 1991.
- GAZZINELLI, R. T. et al. Interleukin-12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon- $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, n. 6115, 1993.
- HOPKINS, S. J., ROTHWELL, N. J. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 2, p. 83-88, 1995.
- HUNTER, C. A., REMINGTON, J. S. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, p. 1057-1067, 1994.
- JOINER, K. A., DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1169-1172, Apr. 1993.
- KASPER,L.H.; BOOTHROYD,J.C. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: WARREN, Kenneth S. **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. 3. ed. Boston: Blackwell Scientific Publicat., 1993. 610p. p. 269-301.
- KENNEDY, M. K. et al. Interleukin-12 regulates the proliferation of Th1, but not Th2 or Th0, clones. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 2271, 1994.
- KHAN, I. A. et al. Interleukin-12 enhances survival against acute toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1639, 1994.

MADDEN, K. S., FELTEN, D. L. Experimental basis for neural immune interactions.  
**Physiological Reviews**, v. 75, n.1, p. 77-106, 1995.

MINELLI, L. M. S. **Identificação, isolamento e caracterização parcial de uma lectina de *Toxoplasma gondii*, ligante de D-galactose.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1995. 107 p. (Tese, Mestrado).

MINEO, J. R. **Técnicas imunoenzimáticas com抗ígenos de *Toxoplasma gondii* em suportes sólidos, na sorologia da toxoplasmose humana.** São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Departamento de Microbiologia e Imunologia, 1980. (Tese, Mestrado).

MINEO, J.R. **Detecção de抗ígenos e de anticorpos, com técnicas imunoenzimáticas, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose “aguda”.** São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Departamento de Microbiologia e Imunologia, 1982. (Tese, Doutorado).

MOORE, K. W. et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr virus gene BCRFI. **Science**, v. 248, n. 1230, 1990.

MORRISSETTE, N. S. et al. Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 445-459, 1994 apud MINELLI, L. M. S. **Identificação, isolamento e caracterização parcial de uma lectina de *Toxoplasma gondii*, ligante de D-galactose.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1995. 107 p. (Tese, Mestrado).

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 2348, 1986.

NATAL, C.L. et al. Níveis de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ratos experimentalmente infectados e bloqueio de vias dopaminérgicas centrais. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA, 20., 1995, Angra dos Reis. **Resumos...** Angra dos Reis: SBI, 1995. “não paginado”.

OKAY, T. S. **Etude de la kystogenèse *Toxoplasma gondii* chez le rat immunocompetent immunodeprime et dans un modèle d'infection congénitale. Caractérisation génotypique de différentes souches et clones toxoplasmiques par**

**amplification aleatoire.** Grenoble: Universite Joseph Fourier, 1994. 118p. (Tese, Doutorado).

PELEMAM, R. et al. Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon- $\gamma$  by human mononuclear cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 1751, 1989.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. Sporozoea - Família Sarcocystidae: Gêneros *Toxoplasma* e *Sarcocystis*. In: . **Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 872 p. p. 252-274.

RABIN, B. S. et al. Bidirectional interaction between the central nervous system and the immune system. **Critical Reviews in Immunology**, v. 9, n. 4, p. 279-312, 1989.

REY,L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: . **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731 p. p. 274-285.

ROTHWELL, N. J., HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 3, p. 130-136, 1995.

SIBLEY, L. D. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers antitoxoplasmal activity of IFN- $\gamma$  primed macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 2340, 1991.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and IFN- $\gamma$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 169, 1992.

SILVA, J. S. et al. TNF and IFN- $\gamma$  mediate *in vivo* resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice through modulation of nitric oxide production, 1995 (no prelo).

SOETE, M. et al. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite- tachyzoite interconversion in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 76, p.259-264, 1993.

STOUT, R. D., BOTTOMLY, K. D. Antigen specific activation of effector macrophages by IFN- $\gamma$  producing (Th1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (Th2) T cell clones to activate effector function in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 142, n. 760, 1989.

SUZUKI, Y. et al. Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3050, 1990.

- TOMAVO, S. et al. Caracterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*.  
**Infection and Immunity**, v. 59, n. 10, p. 3750-3753, Oct. 1991.
- WILSON, M. B., NAKANE, P. K. In: KANPP, W., HOLUBAR, K., WICK, G. eds.  
**Immunofluorescence and related staining techniques**. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Press, 1978, p. 215-224.
- WOODISON, G., SMITH, J. E. Identification of the dominant cyst antigens of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, p. 389-392, June 1990.