

NEIDE MARIA DA SILVA

MON
616.943.1
55862
TES/MSM

**IMUNOREATIVIDADE DOS CISTOS CEREBRAIS DE *T. GONDII*, FRENTE A DIFERENTES
ANTISOROS, EM CAMUNDONGOS C57BL/6 QUE SOFRERAM DEPLEÇÃO DE CÉLULAS
T CD4⁺ E/OU T CD8⁺ OU QUE FORAM NEUTRALIZADOS DE IFN- γ OU TNF- α**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso
de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia.

DIRBI/UFU



1000179192

Universidade Federal de Uberlândia

Março - 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**IMUNOREATIVIDADE DOS CISTOS CEREBRAIS DE *T. GONDII*, FRENTE A DIFERENTES
ANTISOROS, EM CAMUNDONGOS C57BL/6 QUE SOFRERAM DEPLEÇÃO DE CÉLULAS
T CD4⁺ E/OU T CD8⁺ OU QUE FORAM NEUTRALIZADOS DE IFN- γ OU TNF- α**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso
de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Orientanda: Neide Maria da Silva

Março - 1997

*"Quem deve ser levado em conta não é aquele que censura,
que denuncia os tropeços dos fortes ou
as limitações dos beneméritos;
o valor pertence ao homem que está de fato na
arena, cujo rosto está desfigurado pela poeira,
pelo suor e pelo sangue;
que luta valentemente, que erra, falha e torna a falhar;
que conhece os grandes entusiasmos, as grandes dedicações;
que se empenha numa causa justa e que
quando vence, conhece finalmente a vitória das grandes
realizações e, na pior das hipóteses se fracassa,
será enquanto se aventura magnificamente,
de modo que seu lugar nunca será junto àquelas almas
timoratas que não conhecem a vitória nem a derrota."*

Theodore Roosevelt

Aos meus pais, Geraldo e Dalva, pelo exemplo de vida que sempre representaram para mim e pelo carinho e incentivo constantes.

Aos meus irmãos, Nélia e Nélvio, por estarem sempre disponíveis e compreensivos nos meus momentos de necessidade.

Aos meus sobrinhos, João Ricardo, Letícia e Gustavo, pelas horas de inocência e alegria.

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pela competente orientação e paciência com que soube entender as minhas indecisões, as minhas aspirações, permitindo-me caminhar com independência na realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. *Ricardo T. Gazzinelli*, pela valiosa contribuição em nos fornecer os blocos de parafina contendo o tecido dos animais, para confecção deste experimento.

Ao Dr. *Antônio Gomes de Amorim Filho* que gentilmente, nos forneceu o antisoro anti Hsp70.

Ao Dr. *João Kazuyuki Kajiwara* pelo apoio na análise das imagens, imprescindível para este projeto.

Ao Prof. *Silvio Favoretto* por ter auxiliado na obtenção do antisoro anti-Hsp70.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelos ensinamentos e incentivos durante todo o curso.

Ao Prof. Dr. *César Laerte Natal*, pelo apoio e amizade irrestrito em todos os momentos.

À *Deise Aparecida de Oliveira Silva*, pela amizade e pelas sugestões e apoio constante que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

À *Maria Aparecida de Souza*, por ter me recebido tão carinhosamente em sua casa em Ribeirão Preto, para realização de parte deste trabalho.

À *Eloísa Amália Vieira Ferro*, pela amizade, por sua indispensável colaboração na confecção dos cortes histológicos e fotografias.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, *Aldo Matos, Carlos Roberto da Silva, Eleuza R. Machado, Flávia Andrade Chaves Borges*, pelo espírito de companheirismo e em especial ao *Aldo e Flávia*, por sempre me incentivarem.

Ao secretário do curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, *João Martins Neto*, pela disponibilidade em nos ajudar.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia, *Antônio Tomás Júnior e Hélio Elias Costa Júnior*, pelo auxílio e presteza.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, *Elaine Vicente Lourenço, Elizabeth Oliveira Miranda, Guilherme Rosemberg Guimarães Queiroz, Hercílio Higino da Silva Filho, Maria Aparecida Gerra Lage, Maria de Fátima Pereira, Ronize Andréia Ferreira, Sílvia da Cunha Canto Ferreira, Simone Cardoso Leon*, pelos anos de convívio, incentivo e colaboração; agradeço especialmente aos colegas *Elaine, Elizabeth, Guilherme e Ronize* por compartilharem comigo dos momentos mais difíceis.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa, a qual tornou possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1) Introdução	1
1.1) Histórico	2
1.2) Taxonomia e ciclo biológico	2
1.3) Morfologia do parasita	4
1.4) Metabolismo do parasita	5
1.5) Antígenos estágio específicos do parasita	5
1.5.1) Antígenos específicos de taquizoítas	6
1.5.2) Antígenos específicos de bradizoítas	7
1.5.3) Antígenos específicos do estágio oocisto/ esporozoíto	8
1.6) Antígenos compartilhados entre os estágios de taquizoítas, bradizoítas e oocisto/esporozoíto	8
1.7) Antigenicidade de diferentes cepas de <i>T. gondii</i>	9
1.8) Infecção de células hospedeiras	10
1.9) Formação do vacúolo parasitóforo	12
1.10) Interconversão de taquizoíto em bradizoíto	14
1.11) Cistos teciduais	16
1.12) Relação antígenos císticos e sistema imune	17
1.13) Epidemiologia	19
1.14) Resposta imune ao <i>T. gondii</i>	21
1.14.1) Resposta imune humoral	22
1.14.2) Resposta imune mediada por células	23
A) Imunidade inata	23

B) Imunidade específica	25
1.14.3) Mecanismos efetores mediados por IFN- γ e TNF- α	30
1.14.4) Encefalite toxoplásmica	30
1.15) Regulação da resposta imune	33
1.16) Resposta imune por células T $\gamma\delta$	34
1.17) Proteínas de choque térmico (Hsps)	36
2) Objetivos	39
3) Material e métodos	42
3.1) Infecção experimental e tratamento com anticorpos monoclonais	43
3.2) Fixação e processamento do material para microscopia de luz	44
3.3) Antisoros utilizados na reação de imunocitoquímica	45
3.3.1) Obtenção de antisoro anti-cepa PJA	45
3.4) Reação de ELISA para definir a diluição dos antisoros primários a serem utilizados na reação de imunocitoquímica	46
3.4.1) Reação de ELISA para definição da diluição dos antisoros produzidos em coelho	46
3.4.2) Reação de ELISA para definição da diluição do antisoro produzido em camundongo	47
3.5) Preparo do antisoro secundário anti-coelho para ser utilizado nas reações de imunocitoquímica	48
3.5.1) Dosagem protéica de γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho	48
3.5.2) Biotinilação de γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho	48
3.5.3) ELISA para definição do título do antisoro secundário	49
3.6) Padronização da reação de imunocitoquímica	50

3.6.1) Reação de imunocitoquímica utilizando o antisoro secundário de cabra anti-coelho marcado com peroxidase	50
3.6.2) Reações de imunocitoquímica utilizando o antisoro secundário de carneiro anti-coelho biotilado e amplificação com Kit ABC	52
3.6.2.1) Reação de imunocitoquímica	52
3.6.2.2) Reação de imunocitoquímica com resgate antigênico com tripsina	54
3.6.2.3) Reação de imunocitoquímica utilizando resgate antigênico com forno microondas e absorção do antisoro primário com soro de camundongo normal	56
3.6.3) Reação de imunocitoquímica utilizando antisoro de camundongo anti-cepa PJA e resgate antigênico com forno microondas	58
3.7) Eletroforese em gel de poliacrilamida e “Western blotting” utilizando antisoro anti-Hsp70 para detecção de bandas reconhecidas em <i>T. gondii</i>	60
3.8) Microscopia de luz	61
3.9) Análise de imagens	62
3.10) Análise estatística	64
4) Resultados	65
4.1) Resultados do teste ELISA para definição dos títulos dos antisoros primários, produzidos em coelho e camundongo	66
4.1.1) Resultados do teste ELISA para definição dos títulos dos antisoros primários produzidos em coelho	66
4.1.2) Resultados do teste ELISA para definição do título do antisoro primário anti-cepa PJA produzido em camundongo	68

4.2) Definição dos títulos dos antisoros primários a serem utilizados nas reações de imunocitoquímica	70
4.3) Resultado do teste ELISA para definição do título do antisoro secundário γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho biotinilada	72
4.4) Padronização da reação de imunocitoquímica	72
4.4.1) Resultado da reação de imunocitoquímica utilizando antisoro secundário de cabra anti-coelho marcado com peroxidase	72
4.4.2) Resultado da reação de imunocitoquímica utilizando antisoro secundário γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho biotinilada	72
4.4.2.1) Resultado da reação de imunocitoquímica com resgate antigênico com tripsina	73
4.4.2.2) Resultado da reação de imunocitoquímica com resgate antigênico com forno microondas	75
4.4.3) Resultado da reação de imunocitoquímica utilizando antisoro de camundongo anti-cepa PJA e resgate antigênico com forno microondas	75
4.5) Análise a nível de microscopia de luz	76
4.5.1) Presença de taquizoítas livres no tecido cerebral e correlação com o déficit imunológico do animal	76
4.5.2) Número de cistos por seção de tecido cerebral e correlação com o déficit imunológico do animal	78
4.6) Análise de imagens - Fotometria	81
4.6.1) Área de cistos por seção de tecido cerebral de camundongo C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i> e correlação com o déficit imunológico do animal	81

4.6.2) Diâmetro de cistos por seção de tecido cerebral de camundongo C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i> e correlação com o déficit imunológico do animal	83
4.6.3) Resultados da análise de intensidade de marcação para antígeno de taquizoíta P30 na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal anti-P30 e correlação com o déficit imunológico do animal	85
4.6.4) Resultados da análise de intensidade de marcação para antígeno P22 na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal anti-P22 e correlação com o déficit imunológico do animal	95
4.6.5) Resultados da análise de intensidade de marcação para a proteína de “stress” de 70 kDa na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal de coelho anti-Hsp70 e correlação com o déficit imunológico do animal	106
4.6.6) Resultados da análise de intensidade de marcação para antígeno da cepa PJA na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal de camundongo anti-cepa PJA e correlação com o déficit imunológico do animal	115
4.6.7) Resultados da análise de intensidade de marcação para antígeno da cepa RH na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal de coelho anti-cepa RH e correlação com o déficit imunológico do animal	124
4.6.8) Resultados da análise de intensidade de marcação para antígeno da cepa PLK na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal de coelho anti-cepa PLK e correlação com o déficit imunológico do animal	133

4.6.9) Resultados da análise de intensidade de marcação para antígeno da cepa PTgB na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal de coelho anti-cepa PTgB e correlação com o déficit imunológico do animal	141
4.6.10) Resultados da análise de intensidade de marcação para antígeno da cepa CEP na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal de coelho anti-cepa CEP e correlação com o déficit imunológico do animal	149
4.6.11) Resultados da análise de intensidade de marcação para antígeno do estágio de oocisto de <i>T. gondii</i> na área dos cistos cerebrais, utilizando antisoro policlonal de coelho anti-oocisto e correlação com o déficit imunológico do animal	157
4.7) Detecção de proteína de “stress” de 70 kDa em <i>T. gondii</i> através de análise por “Western blot”	165
5) Discussão	167
5.1) Reação de imunocitoquímica	169
5.2) Presença de taquizoítas livres no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	171
5.3) Número de cistos no cérebro de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	172
5.4) Área e diâmetro dos cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	174

5.5) Expressão de antígenos específicos de taquizoítas nos cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	176
5.6) Expressão de proteína de choque térmico-Hsp70 nos cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	181
5.7) Expressão de antígeno da cepa PJA nos cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	184
5.8) Expressão de antígeno das cepas RH, PLK, PTgB, CEP nos cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	185
5.9) Expressão de antígeno do estágio de oocisto nos cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	189
6) Conclusões	191
7) Resumo	194
8) Summary	197
9) Referências bibliográficas	199

Introdução

1) INTRODUÇÃO

1.1) HISTÓRICO

Toxoplasma gondii, um parasita protozoário obrigatório, foi descrito por Nicole e Manceaux em 1908, que o encontraram no cérebro de um roedor do norte da África, o *Ctenodactylus gondi* (Pfefferkorn, 1990). Foi ao mesmo tempo descrito no Brasil por Splendore, que o isolou de um coelho, significando que o organismo já estava presente em ao menos duas espécies de mamíferos em dois continentes amplamente separados (Feldman, 1982).

Na espécie humana o parasita foi primeiro descrito por Janku em 1923 na Tchecoslováquia, em uma criança que aparentemente morreu de toxoplasmose disseminada (Feldman, 1982).

O nome do gênero é derivado da palavra grega "toxon" (arco), em referência ao formato em crescente do organismo e o da espécie vem do roedor em que ele foi descrito, o *Ctenodactylus gondi* (Pfefferkorn, 1990).

1.2) TAXONOMIA E CICLO BIOLÓGICO

O parasita pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae (Rey, 1991).

O parasita está amplamente distribuído pelo mundo e é o agente causal da zoonose toxoplasmose.

O ciclo biológico completo do parasita acontece em duas fases, uma assexuada que ocorre tanto nos hospedeiros intermediários como nos definitivos e uma fase sexuada ou ciclo

enteroepitelial que ocorre apenas nos hospedeiros definitivos, os felídeos domésticos e selvagens (Feldman, 1982).

A fase assexuada ocorre em aves e mamíferos e o parasita se divide por endodiogenia, um processo semelhante a divisão binária (Kasper & Boothroyd, 1993), onde uma célula mãe dá origem a duas células filhas e logo a seguir se degenera.

Quando cistos teciduais contendo os bradizoítas, forma de multiplicação lenta, são ingeridos por hospedeiros não felinos, a membrana dos cistos se rompe na presença do pH ácido do suco gástrico, os bradizoítas são liberados e penetram no epitélio do intestino delgado se transformando em taquizoítas que se dividem rapidamente, provocando uma infecção aguda sistêmica. A maioria dos taquizoítas são eliminados pela resposta imune mediada por células e humoral e sete a dez dias após a infecção sistêmica por taquizoítas, cistos teciduais contendo bradizoítas se desenvolvem. Estes ocorrem em uma variedade de órgãos do hospedeiro mas principalmente dentro do sistema nervoso central e músculos, onde podem permanecer por toda a vida do hospedeiro (Kasper & Boothroyd, 1993).

O ciclo de vida sexual do parasita é definido pela formação de oocisto/esporozoíta no hospedeiro felino. Este ciclo começa com a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítas e culmina após vários estágios intermediários na produção de micro e macrogametas. O microgameta é flagelado, permitindo ao parasita procurar pelo macrogameta. A fusão dos gametas produz um zigoto que secreta uma membrana cística rígida e este é eliminado com as fezes como oocisto não esporulado. Durante a infecção aguda, um gato pode eliminar 100 milhões de parasitas por dia (Kasper & Boothroyd, 1993). Segundo Dubey apud Jackson & Hutchison (1989) os oocistos eliminados não são imediatamente infectivos e após 1 a 5 dias de exposição ao ar e temperatura ambiente, ocorre esporulação, produzindo dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítas. Estes oocistos estáveis, são altamente infecciosos e podem permanecer viáveis por muitos anos no solo. Quando ingeridos, os esporozoítas

liberados dos oocistos infectam o epitélio intestinal, produzindo taquizoítas que se multiplicam rapidamente produzindo uma infecção aguda, depois crônica, com bradizoítas encistados completando o ciclo de vida natural (Kasper & Boothroyd, 1993).

1.3) MORFOLOGIA DO PARASITA

Segundo Pfefferkorn (1990), taquizoítas de *T. gondii* são células em formato de arco ou crescente, medem ao redor de 6µm de comprimento por 2µm de largura. Eles compartilham muitas características citológicas com outras células eucarióticas, incluindo um núcleo, mitocôndria, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático. Como membros do filo Apicomplexa e da subclasse Coccidia, apresentam um número de estruturas características. Os taquizoítas são cobertos com três unidades de membrana que juntas formam uma película. A membrana externa é contínua e as duas membranas mais internas são descontínuas, terminando em estruturas chamadas anéis polares, que são localizados nas extremidades anterior e posterior do parasita. As membranas mais internas também têm duas aberturas chamadas microporos que podem estar envolvidas na passagem de nutrientes. O citoesqueleto subpelicular é composto por 22 microtúbulos que se estendem do anel polar anterior até mais que a metade do comprimento do parasita. A extremidade anterior do *T. gondii* é marcada pela presença do aparelho apical, composto pelo conóide, um cone oco de fibras provavelmente microtúbulos que se cruzam obliquamente e três anéis polares. Apresentam ainda as roptrias, que são estruturas em formato de clava, densamente osmofílicas, cujas extremidades estreitas terminam no conóide e possuem provavelmente função secretória durante a penetração do parasita na célula hospedeira. Entre as roptrias está um grande número de vesículas osmofílicas menores chamadas micronemas que podem também ter um papel na penetração do parasita.

1.4) METABOLISMO DO PARASITA

No metabolismo do parasita a glicose é a principal fonte de energia. Ela é oxidada segundo o esquema de Embden-Meyerhof da glicólise fosforilativa. O açúcar é desdobrado em ácido láctico, acético e outros produtos. O *T. gondii* consome oxigênio e produz CO₂, tendo um sistema citocromo que oxida o NADH. Possuem também uma catalase que lhes permite suportar concentrações de H₂O₂, letais para outros protozoários. Os parasitas apresentam pequenos grânulos que parecem conter reservas de glicogênio, mais volumosos nos bradizoítas dentro dos cistos, o que os torna positivos à reação com ácido periódico-Schiff (Rey, 1991). O parasita apresenta uma diidrofolato redutase (DHFR) própria pois não pode utilizar folatos pré-formados como o fazem células mamíferas (McLeod *et al.*, 1991). A energia (ATP) requerida para suportar o crescimento intracelular do *T. gondii* é produzida pelo próprio parasita; talvez, a dependência pela célula hospedeira seja devido à incapacidade da síntese “de novo” de purinas pelo parasita (Pfefferkorn, 1990).

1.5) ANTÍGENOS ESTÁGIO ESPECÍFICOS DO PARASITA

Em termos ultra-estruturais existem fortes similaridades entre taquizoítas e bradizoítas de *T. gondii*. Entretanto, os dois estágios produzem um fenótipo muito diferente; taquizoítas se dividem rapidamente formando rosetas e lisando a célula hospedeira, enquanto os bradizoítas dividem-se lentamente e tornam-se enclausurados dentro de uma parede cística rica em carboidratos. Estas variações morfológicas devem refletir diferenças no metabolismo dos dois estágios e expressão de antígenos estágio específicos (Zhang & Smith, 1995). Segundo Dubey & Frenkel (1976), existem diferenças entre taquizoítas e bradizoítas de *T. gondii*; os bradizoítas apresentam grânulos grandes que se coram pelo ácido periódico de Schiff (PAS),

núcleo subterminal, são menores e mais delgados que os taquizoítas e segundo Jacobs et al. apud Lunde & Jacobs (1983), os taquizoítas são imediatamente destruídos pelo suco gástrico artificial (pepsina-HCl) enquanto os bradizoítas sobrevivem à digestão péptica por até 3 horas, sugerindo que existam diferenças antigênicas entre as duas formas do parasita.

Lunde & Jacobs (1983), demonstraram pela primeira vez, utilizando o método de imunofluorescência, que existem diferenças antigênicas entre dois estágios do ciclo de vida do *T. gondii*, endozoítas e cistozoítas.

1.5.1) ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE TAQUIZOÍTAS

Vários estudos têm sido realizados para elucidar diferenças ou similaridades antigênicas entre os diferentes estágios do parasita. Existem antígenos específicos dos estágios de taquizoítas, bradizoítas e oocisto/esporozoíta; estes antígenos podem ser identificados por várias técnicas imunológicas usando anticorpos policlonais e monoclonais, confirmando especificidade tanto morfológica quanto imunológica destes estágios (Kasper, 1989). P30 (SAG-1) é o principal antígeno de taquizoíta e é reconhecido por soro de indivíduos infectados tanto da fase aguda quanto crônica; é a principal proteína de membrana radioiodinável (Kasper *et al.*, 1983). O antígeno P30 que constitui cerca de 5% da proteína total de taquizoíta, é conservado entre a maioria das cepas de *T. gondii* testadas, é hidrofóbico com um ponto isoelétrico levemente ácido. Ele está homogeneamente distribuído na superfície, dentro de taquizoítas e na rede tubular do vacúolo parasitóforo (McLeod *et al.*, 1991). De acordo com estudos de localização ultra-estrutural, o antígeno P30 está localizado na superfície celular e também dentro das roptrias do estágio de taquizoítas apenas (Boulanger *et al.*, 1991). O antígeno P22 é um dos quatro antígenos principais de taquizoítas (Parmley *et al.*, 1992). Antígenos de superfície de taquizoítas, tais como P30 e P22 estão ausentes em bradizoítas (Parmley *et al.*, 1994).

Couvreur *et al.* (1988), caracterizaram por métodos de imunofluorescência, “Western-blotting” e imunoprecipitação de antígenos de superfície de taquizoítas radioiodinados, cinco antígenos de superfície específicos deste estágio de *T. gondii* - P43, P35, P30, P23 e P22 - sendo P23 até então não descrito na literatura.

1.5.2) ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE BRADIZOÍTAS

Com o auxílio de anticorpos monoclonais, Omata *et al.* (1989) identificaram um antígeno de 20 kDa aparentemente localizado no citoplasma, especificamente sintetizado por parasitas císticos (cistozoítas) e que não são expressos em taquizoítas. Três proteínas de bradizoítas que se comportam como antígenos de superfície P36, P34, P21 e a proteína P18 que provavelmente se localiza mais profundamente na película do bradizoíta, foram identificadas através do método de imunofluorescência e “Western-blotting” por Tomavo *et al.* (1991). Estes antígenos não são expressos em taquizoítas e não são sensíveis à pepsina, mas apresentam alguma sensibilidade à tripsina (Tomavo *et al.*, 1991). Weiss *et al.* (1992), produziram anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos específicos de bradizoítas, como o antígeno de 28 kDa; este, por técnica de imunofluorescência, parece estar presente no material granular dentro do citoplasma e entre os parasitas no cisto intacto. Estes anticorpos monoclonais reconhecem também o antígeno de 116 kDa que, por reação fraca de imunofluorescência, está presente na periferia do parasita e parede do cisto; provavelmente, apresenta um epítopo carboidrato pois ele é reconhecido por anticorpo da classe IgG3, que freqüentemente está associado a epítomos carboidratos. Bohne *et al.* (1993a) produziram também anticorpos monoclonais contra antígenos específicos de bradizoítas, o anticorpo 7E5 específico para o antígeno de 30 kDa, que não reage contra o antígeno de 30 kDa de taquizoíta.

1.5.3) ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DO ESTÁGIO OOCISTO/ESPOROZOÍTO

Através do estudo soroepidemiológico de pacientes de um surto de toxoplasmose comprovadamente transmitido por água contaminada por oocistos, Kasper & Ware (1985) mostraram através da técnica de "Western-blotting" que existem antígenos específicos do estágio oocisto/esporozoíta e estes são de aproximadamente 67 kDa e 190 kDa. Mostraram também, pelo teste ELISA, que estes antisoros reagiam com antígenos de taquizoítas tanto quanto com os de oocisto/esporozoíta. Esporozoítas de *T. gondii* apresentam duas proteínas de peso molecular aproximado de 25 kDa e 67 kDa que não estão presentes no estágio de taquizoítas; e esporozoítas de *T. gondii* parecem ser deficientes na principal proteína de taquizoíta P30 (Kasper *et al.*, 1984).

1.6) ANTÍGENOS COMPARTILHADOS ENTRE OS ESTÁGIOS DE TAQUIZOÍTAS, BRADIZOÍTAS E OOCISTO/ESPOROZOÍTA

Alguns antígenos são também compartilhados entre os três estágios do parasita (Kasper, 1989). Ángel *et al.* (1991) observaram pelo método de imunofluorescência que taquizoítas, esporozoítas e bradizoítas compartilham determinantes antigênicos comuns que se encontram distribuídos pela membrana parasitária. Os antígenos P43 e P23 de taquizoítas são também expressos em bradizoítas (Tomavo *et al.*, 1991). Através de técnicas de imunoprecipitação, foi determinado que quatro antígenos de taquizoítas, de 63, 43, 39 e 28,5 kDa, são também compartilhados por bradizoítas, sendo o antígeno de 63 kDa de membrana e os demais excretados e secretados (Darcy *et al.*, 1990). Makioka *et al.* (1991), utilizando cepas de baixa virulência, ME-49 e Fukaia, demonstraram pela técnica de "Western-blotting"

que ambos os estágios taquizoítas e bradizoítas de ambas as cepas compartilham antígenos comuns.

1.7) ANTIGENICIDADE DE DIFERENTES CEPAS DE *T. GONDII*

Quanto à antigenicidade, diferentes cepas de *T. gondii* têm sido isoladas e estas são geralmente classificadas como virulentas ou avirulentas com base na sua patogenicidade para o modelo experimental camundongo (Bohne *et al.*, 1993c). Existem 3 linhagens clonais de *T. gondii*, e a virulência aguda para camundongos em cepas do tipo I, é regulada por uma região ligada ao locus SAG-1 no cromossomo VIII do parasita (Howe *et al.*, 1996). Gross *et al.* (1991) descreveram um antígeno de 23 kDa, distribuído difusamente na superfície do parasita, que parece ser cepa específico e associado com virulência.

Um estudo detalhado de antígenos cepa específicos do parasita foi realizado *in vitro* por Ware & Kasper (1987). Eles produziram antisoros de coelho contra taquizoítas de três cepas diferentes. A cepa virulenta RH (Sabin, 1941) que é a mais comumente estudada, foi originalmente obtida de tecido humano infectado (isolada em 1939 de um menino de 6 anos de idade que morreu devido à parasitose) e vem sendo mantida em laboratório desde 1941, por passagem em cavidade peritoneal de camundongo ou por cultivo em fibroblasto humano; ela não produz cistos teciduais contendo bradizoítas nem oocisto/esporozoíto. A cepa PTg ou PLK, um clone da cepa ME-49 que foi originalmente isolada de músculo de carneiro em 1965 (Suzuki *et al.*, 1989a), tem relativamente baixa virulência e produz muitos cistos em infecção crônica; é mantida em laboratório por infectar cronicamente camundongos através de inoculação intraperitoneal de cistos. A cepa CEP foi obtida de um gato naturalmente infectado. Através de técnicas de imunoprecipitação e “Western-blotting” foram observados antígenos que são cepa específicos e antígenos que são comumente compartilhados.

1.8) INFECÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

O parasita pode infectar todas as células nucleadas de mamíferos, eritrócitos aviários, eritrócitos imaturos mamíferos e também culturas primárias de células de peixes e insetos. Como ele pode infectar uma variedade de tipos histológicos de todos os mamíferos e aves, isto exclui a probabilidade de uma proteína específica como receptor e supõe um receptor que é comum à membrana plasmática da maioria das células (Kasper & Mineo, 1994).

T. gondii pode infectar uma variedade de hospedeiros, incluindo humanos, animais domésticos e selvagens e aves. O processo de infecção da célula hospedeira envolve dois passos: aderência e penetração ou invasão. Primeiramente ocorre o reconhecimento e adesão à célula alvo, o parasita no encontro com a célula alvo, avalia a membrana até encontrar um ponto de adesão, que é reconhecido pelo seu pólo apical (Kasper & Mineo, 1994). A adesão é mediada via interação receptor da célula hospedeira e molécula ligante do parasita. As moléculas envolvidas são: laminina do parasita e receptor de laminina da célula alvo, proteína principal de superfície de taquizoíta SAG-1 (P30) e receptor glicosilado na célula alvo e moléculas como lectina (Sharma *et al.*, 1983; Werk, 1989), estas na superfície do *T. gondii* (Joiner & Dubremetz, 1993; Kasper & Mineo, 1994).

Grimwood & Smith (1992), observaram que um anticorpo monoclonal C1E3 reconhecendo a proteína de superfície P30 reduz em 37% a invasão de células de rim de bovino adulto. Em estudos utilizando anticorpo monoclonal (6A8) anti-SAG-1 (P30), observou-se que estes foram aptos a bloquear 65% da aderência do parasita às células hospedeiras, mostrando o importante papel de P30 na infecção (Mineo & Kasper, 1994). O receptor para esta proteína é glicosilado, como demonstrado em experimentos de inibição da infecção pela neoglicoproteína BSA-glucosamida, que competitivamente bloqueia a infecção de fibroblastos humanos por taquizoítas com P30 de superfície, mais que aqueles deficientes

em P30 (Mineo *et al.*, 1993). Parasitas mutantes deficientes em P30, cepa PTgB (Mineo *et al.*, 1993) e parasitas com mutação na proteína P30, PTgA e PTgC apresentam uma aderência reduzida à célula hospedeira, mas não total, mostrando que existem outros componentes envolvidos; então, *T. gondii* apresenta um sistema redundante para aderência à célula hospedeira (Mineo & Kasper, 1994).

O estágio taquizoíta adere a integrinas $\beta 1$ em fibroblastos (Joiner, 1991). Furtado *et al.* (1992a e b) observaram que taquizoítas de *T. gondii* coletados de cultivo celular ou de camundongos são cobertos com a proteína de matriz extracelular, laminina e que esta participa na aderência à integrina $\alpha 6 \beta 1$ de fibroblastos humanos, células do ovário de Hamster chinês (CHO) e também a macrófagos. A distribuição disseminada de $\beta 1$ integrinas e laminina facilita a invasão de taquizoítas em uma ampla variedade de células alvo (Joiner, 1991; Kasper & Mineo, 1994).

Parece que receptores de moléculas ligantes do parasita na célula hospedeira podem ser expressos em tempos específicos durante o ciclo celular (Mineo & Kasper, 1994); é o que se observa pela falta de homogeneidade na ligação à célula hospedeira; algumas células ligam vários parasitas enquanto outras, nenhum. A habilidade de parasitas para infectar células mamíferas parece aumentar quando a célula hospedeira progride da fase G_1 à fase S e diminui quando a célula entra na fase $G_2 - M$ (Dvorak & Crane, 1981; Grimwood *et al.*, 1996).

A invasão ocorre como uma cascata de eventos individuais: aderência à célula hospedeira, protusão do conóide, formação de movimentos “junction” e “gliding” do parasita (movimentos de rotação), exocitose de micronemas e exocitose de roptrias, liberando o fator “Penetration Enhancing Factor” ou ROP1 (Pfefferkorn, 1990; Joiner & Dubremetz, 1993; Kasper & Mineo, 1994).

A motilidade do parasita através de movimentos de “twisting” e “gliding” está provavelmente relacionada ao fenômeno de “capping”, onde proteínas peliculares aderidas ao

substrato são transportadas para o posterior do parasita, resultando em movimento para frente. A direção é determinada por microtúbulos subpeliculares atuando através de uma série linear de proteínas intramembranas (Pfefferkorn, 1990).

1.9) FORMAÇÃO DO VACÚOLO PARASITÓFORO

O parasita penetra na célula hospedeira ao mesmo tempo que gera a membrana do vacúolo parasitóforo com a participação da membrana plasmática da célula hospedeira (Kimata & Tanabe, 1987; Pfefferkorn, 1990). A membrana especializada do vacúolo parasitóforo não apresenta marcadores da membrana plasmática da célula hospedeira, tornando-o incompetente para se fundir a outros compartimentos celulares como lisossomos e ainda, por análises de criofratura, foi verificado que a membrana do vacúolo representa essencialmente uma bicamada fosfolípida (Joiner & Dubremetz, 1993). A invasão do *T. gondii* é ativamente dirigida pelo parasita, o que é observado com o uso de citocalasina D (desestabiliza microfilamentos), que bloqueia a entrada do parasita em células resistentes a droga (Sibley, 1995). Observações ultra-estruturais por técnica imunoeletrônica demonstram que a proteína de superfície de taquizoíta P30 está presente na rede de membrana e na membrana do vacúolo parasitóforo logo após a invasão do parasita, sugerindo que produtos de *Toxoplasma* migram da superfície do parasita para a membrana do vacúolo, tornando-a uma membrana híbrida (Kimata & Tanabe, 1987). Localização por imunoperoxidase de antígeno do taquizoíta SAG-1 (P30), ao nível de microscopia eletrônica, confirma que proteínas de superfície do parasita são liberadas durante o processo de invasão. Esta proteína está presente nos taquizoítas filhos e é encontrada por toda célula infectada em vacúolos distintos, sendo estes extensões diretas do vacúolo parasitóforo ou representam um verdadeiro vacúolo de exportação de SAG-1 da célula hospedeira para o meio externo (Grimwood & Smith, 1995). Por observações feitas por

até 48 horas após a invasão do parasita, esta proteína ainda continua a ser expressa. A proteína SAG- 2 (P22) apresenta uma distribuição semelhante a SAG-1 e ambas são pouco abundantes na rede tubular do vacúolo parasitóforo (Grimwood & Smith, 1995).

A proteína ROP1 ou proteína de ropria 1 ou “Penetration Enhancing Factor”, que é secretada pelo parasita ao tempo de invasão da célula hospedeira, mostra uma assimetria incomum de carga e aminoácidos. É possível que ROP1 tenha a função de se ligar a componentes da célula hospedeira e facilitar a penetração do *T. gondii* (Ossorio *et al.*, 1992). Uma outra molécula recentemente descrita que auxilia no processo de invasão, é uma fosfolipase do *T. gondii*, que possivelmente altera a fluidez da membrana da célula alvo (Joiner & Dubremetz, 1993; Kasper & Mineo, 1994).

Proteínas GRA 1 (27 kDa), GRA 2 (28,5 kDa) e GRA 5 (21 kDa), são antígenos localizados nos grânulos densos de taquizoítas (Charif *et al.*, 1990) e bradizoítas, sendo que GRA 2 e GRA 5 estão também localizados em grânulos eletrôn-lucentes, podendo estes serem precursores de grânulos densos (Torpier *et al.*, 1993). GRA 1, GRA 2 e GRA 5 são liberadas ativamente no vacúolo parasitóforo quando da invasão do parasita e GRA 2 e GRA 5 estão intimamente associadas com a parede cística, sugerindo que *T. gondii* encistado pode secretar as proteínas ativamente, apesar de seu estado quiescente (Torpier *et al.*, 1993). Ainda conforme estes autores, GRA 5 apresenta uma forte associação com a parede cística, podendo estar envolvida com a resposta inflamatória e imune. É provável que algumas destas proteínas dentro do vacúolo parasitóforo sejam importantes para nutrição como também para o transporte de moléculas críticas para a sobrevivência do parasita (Mineo *et al.*, 1994). Uma outra proteína que possivelmente está presente nos grânulos densos é uma proteína de 97 kDa e esta parece ser importante para o crescimento do parasita, uma vez que anticorpos monoclonais contra esta proteína inibem seu crescimento em mais que 90% (Mineo *et al.*, 1994).

Quando entra na célula hospedeira, *T. gondii* bloqueia a acidificação do fagossomo. Em contraste, caso os parasitas sejam opsonizados por anticorpo eles induzem rápida acidificação do fagossomo, quando penetram em fagócitos normais. Os parasitas extracelulares são altamente sensíveis ao pH e a habilidade em bloquear a acidificação do fagossomo pode ser importante para sobrevivência do patógeno (Kasper & Boothroyd, 1993).

Seguro dentro do vacúolo parasitóforo, o taquizoíta começa a se multiplicar por endodiogenia, sendo que o tempo de divisão é geralmente de 6 a 8 horas, segundo Kasper & Boothroyd (1993). Como a multiplicação dos taquizoítas progride, o vacúolo parasitóforo expande e preenche mais e mais o citoplasma da célula hospedeira, podendo rompê-la em dois dias e liberar 64 a 256 taquizoítas (Kasper & Boothroyd, 1993).

Em imunocompetentes os cistos teciduais são formados sete a dez dias após a infecção sistêmica com taquizoítas (Kasper & Boothroyd, 1993). A multiplicação de taquizoítas é progressivamente inibida pela resposta imune em desenvolvimento e resulta no “switch” para o desenvolvimento de bradizoítas (Tomavo *et al.*, 1991).

1.10) INTERCONVERSÃO DE TAQUIZOÍTA EM BRADIZOÍTA

A transformação de taquizoítas em bradizoítas não é bem entendida. Durante um curto período de tempo no processo de conversão, os parasitas expressam antígenos específicos de taquizoítas e bradizoítas simultaneamente (Bohne *et al.*, 1993a e b). Taquizoítas da cepa Prugnialud infectando cultivo de células Vero, transformam-se em bradizoítas *in vitro* (Soête *et al.*, 1993). Às 48 horas após a infecção estes parasitas são duplamente marcados, embora marcação para taquizoíta (SAG-1) seja maior e às 72 horas os parasitas perdem completamente os determinantes específicos de taquizoíta. Foi também observado que durante a conversão os vários vacúolos são heterogêneos, alguns completamente positivos para

marcadores de taquizoítas, outros para bradizoítas, sugerindo que o processo de interconversão *in vitro* não é sincrônico.

IFN- γ parece ser o principal mediador de resistência contra infecção por *T. gondii* (Suzuki *et al.*, 1988), provavelmente promovendo o encistamento do parasita. Macrófagos peritoneais de camundongo quando infectados com taquizoítas da cepa NTE e tratados com IFN- γ , mostram um aumento de 32% na expressão de antígenos específicos de bradizoítas 6 dias após a infecção, efeito este não observado em linhagens de macrófagos P388D1 e fibroblastos L929 (Bohne *et al.*, 1993a). Ao contrário, a citocina IFN- γ não foi necessária para formação de cistos em astrócitos cultivados *in vitro*, quando infectados com *T. gondii*, mas controlou a divisão de taquizoítas e permitiu aos cistos permanecerem por longo tempo sem rompimento (Jones *et al.*, 1986). Em experimento seguinte, Bohne *et al.* (1993b) demonstraram que quando se infecta macrófagos derivados da medula óssea com taquizoítas de *T. gondii* (NTE) e os trata com IFN- γ , os parasitas não apresentam expressão de antígenos de bradizoítas e a replicação destes é completamente inibida. Porém, quando se diminui o efeito do IFN- γ , através da diminuição da produção do óxido nítrico pelo uso de N^GMMA, os parasitas voltam a se replicar e apresentam antígenos de bradizoítas, embora alguns vacúolos apresentem população heterogênea de parasitas, sugerindo novamente que a conversão não é um processo sincrônico. O óxido nítrico pode ter uma atuação importante na conversão de estágio. A produção deste a níveis intermediários, reduz a multiplicação de taquizoítas por inibição da cadeia respiratória e promove maior expressão de antígenos de bradizoítas em macrófagos derivados da medula óssea, infectados *in vitro* (Bohne *et al.*, 1994). Outros inibidores da cadeia respiratória, como a oligomicina, são igualmente efetivos em macrófagos murinos e fibroblastos humanos em promover interconversão (Gross & Bohne, 1994). A inibição da cadeia respiratória parece ser o principal mecanismo efetor da conversão para o estágio de bradizoíta (Gross *et al.*, 1996a).

Segundo Soête *et al.* (1994), a conversão de taquizoítas da cepa RH em bradizoítas *in vitro*, ocorre devido a condições adversas do microambiente da célula hospedeira e parasita, o que é observado com a formação de cistos quando se aumenta o pH do meio para 8,0 ou a temperatura de 37° para 43°C, mostrando que o “Switch” taquizoíta-bradizoíta não depende de um imunomodulador (também Jones *et al.*, 1986). Observaram ainda que IFN- γ foi pouco eficiente em acionar a interconversão neste modelo experimental.

1.11) CISTOS TECIDUAIS

O tamanho dos cistos teciduais pode variar de 12 - 14 μm (Jackson & Hutchison, 1989), até 100 μm no cérebro de vertebrados de sangue quente (Garnham *et al.*, 1962). Esta variação está relacionada com o número de parasitas que varia de 2 - 6 a 3000 cistozoítas. Segundo Dubey *et al.* (1992), cistos teciduais de *T. gondii*, geralmente são menores ou iguais a 60 μm de diâmetro no cérebro de animais e homem e 100 μm em músculos.

O tamanho médio dos maiores cistos, 30 a 60 micrômetros de diâmetro, vistos em cobaias infectadas durante 5 anos, não foi maior que aqueles vistos em camundongos infectados por 4 meses. Existe um crescimento limitado no tamanho dos cistos de *Toxoplasma*, ao menos no sistema nervoso central e este tamanho máximo é alcançado dos 3 a 4 meses de inoculação do parasita (Lainson, 1958). O tamanho dos cistos pode variar com a idade dos mesmos. Os cistos formados *in vitro* apresentam características estruturais consistentes com as de sua diferenciação durante infecção natural (McHugh *et al.*, 1993). À microscopia eletrônica apresentam uma única membrana trilaminar que segundo Zhang & Smith (1995) é rica em carboidrato e contém material eletrôn-denso na sua matriz (Jones *et al.*, 1986).

Os fatores que influenciam a formação de cistos *in vivo*, resposta imune ou outros fatores da célula hospedeira, ainda não são claros. A formação de cistos é iniciada enquanto

ainda está ocorrendo proliferação ativa de taquizoítas, antes do aparecimento da resposta imune efetiva, sugerindo que a célula hospedeira mais que a resposta imune possa estar influenciando a formação destes (Ferguson & Hutchison, 1987a). Estes cistos podem estar distribuídos por todo o corpo, mas são freqüentes especialmente no sistema nervoso central, onde parecem persistir em forma latente por toda a vida do hospedeiro, provocando pouca ou nenhuma resposta inflamatória (Ferguson & Hutchison, 1987b). Enquanto a forma proliferativa infecta de forma indiscriminada vários tipos celulares, a formação de cistos no cérebro ocorre predominantemente dentro dos neurônios. Embora a resposta imune possa não ser necessária para iniciação da formação de cistos, ela é vital para controle de endozoítas em proliferação (Ferguson & Hutchison, 1987a).

1.12) RELAÇÃO ANTÍGENOS CÍSTICOS E SISTEMA IMUNE

Existem antígenos únicos de cistos, que segundo alguns autores estimulam a resposta imune em infecção crônica. Parmley *et al.* (1994), identificaram *in vivo* por microscopia eletrônica, um antígeno de 65 kDa na matriz e parede de cistos da cepa ME-49, sendo que este antígeno seria produzido e rapidamente secretado por bradizoítas. Uma outra molécula de 29 kDa foi identificada *in vitro* através de imunofluorescência na matriz de cistos da cepa RRA (Beverley) (Zhang & Smith, 1995).

A imunidade adquirida é mantida através da estimulação repetida do sistema imune por antígenos liberados pelos bradizoítas encistados (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989). Estes antígenos induziriam uma resposta imune contra taquizoítas em novas infecções, sendo esta resposta contra epítomos de antígenos secretados/excretados de reatividade cruzada, entre ambos os estágios do parasita. Estes autores conseguiram identificar um antígeno de 23 kDa (GRA 1), que está presente nos grânulos densos de taquizoítas e bradizoítas. Proteínas

armazenadas nos grânulos densos, que são secretadas por ambos parasitas intra e extracelulares, podem fornecer uma das principais fontes de antígenos circulantes; um destes antígenos, GRA 2, tem sido mostrado proteger camundongos contra desafio letal (Cesbron-Delauw & Capron, 1993). Todavia, experimentos com microscopia eletrônica detectaram pouca quantidade de antígenos associados a bradizoítas, sendo estes abundantemente distribuídos na matriz cística, mas com pequena expressão na célula hospedeira exterior à membrana do vacúolo parasitóforo e pequena expressão também fora da célula infectada (Sims *et al.*, 1990). Woodison *et al.* (1993), examinando indivíduos infectados com o parasita, observaram que a resposta humoral a antígenos de cistos é quantitativamente menor do que a taquizoítas, sendo sugerido por eles que antígenos de cistos podem ser menos imunogênicos, podem ser expressos em menor quantidade, ou o processamento e apresentação destes ser ineficiente, pois ocorrem predominantemente no cérebro ou músculos, ou podem ainda induzir tolerância.

Ferguson *et al.* (1994), não observaram reação de células inflamatórias a cistos teciduais, em experimentos de toxoplasmose cerebral crônica, possivelmente porque estes estão mascarados dentro de células hospedeiras intactas. Provavelmente não exista nenhuma resposta imune a estes cistos e a resposta imune contínua observada em indivíduos cronicamente infectados seria devido a parasitas extracísticos, resultantes da ruptura de cistos ou “turnover” cístico, tal como é visto com a cepa ME 49.

Por causa da natureza imuneprivilegiada do cérebro, parece provável que *T. gondii* evade das consequências da resposta imune antiparasitária do hospedeiro e então permite a persistência de uma grande carga parasitária cística no cérebro (Hunter & Remington, 1994). Segundo Hunter & Remington (1994), esta natureza imuneprivilegiada do sistema nervoso central é evidenciada pela presença da barreira hematoencefálica, pela falta de sistema linfático (o que é contestado por Hart & Fabry [1995], pela identificação de um sistema como linfático

em ratos, coelhos e gatos) e também pelos baixos níveis ou não expressão de moléculas MHC classe I em neurônios (Rall *et al.*, 1995). Em contraste, os achados de Schluter *et al.* (1995), suportam a idéia que o sistema nervoso central é um compartimento imunologicamente controlado, integrado no circuito normal de vigilância imune. No cérebro, a vasta maioria dos cistos são encontrados dentro dos neurônios; isto leva à hipótese que a falta de resposta do hospedeiro é devido ao mascaramento dos cistos (antígenos) dentro das células (Ferguson & Hutchison, 1987a). A ruptura de cistos ocorre intermitentemente em camundongos imunocompetentes; entretanto, é um evento extremamente raro, que não parece ser afetado pela idade do hospedeiro ou período pós-infecção e esta ruptura ocasional pode estimular o sistema imune do hospedeiro levando a persistência de títulos de anticorpo e manutenção da imunidade em pessoas cronicamente infectadas (Ferguson *et al.*, 1989). Em experimentos com macacos, Frenkel & Escajadillo (1987) observaram que o desenvolvimento de encefalite toxoplásmica em animais infectados, ocorre apenas em imunocomprometidos.

1.13) EPIDEMIOLOGIA

Com o desenvolvimento de testes diagnósticos confiáveis, nas últimas duas décadas observa-se que a toxoplasmose está disseminada entre muitas populações humanas e animais. *Toxoplasma* é transmitido por ingestão de oocistos, consumo de carne crua ou mal cozida, transmissão transplacentária, raramente por transplante de órgão, transfusão ou acidente laboratorial (Sharma, 1990).

Em humanos, análises sorológicas em vários grupos populacionais indicam que a prevalência da infecção varia de menos de 5% a 70%, e mesmo de 80% em alguns grupos etários. A infecção é mais freqüente no Caribe e países contíguos, menos prevalente em áreas frias tais como Ártico e talvez ausente na Antártica (Feldman, 1982). Poucos casos são

reconhecidos clinicamente e é estabelecido que a infecção com *Toxoplasma* geralmente é assintomática (Feldman, 1982). Aproximadamente metade da população dos Estados Unidos exibe anticorpos para *Toxoplasma*, indicando infecção subclínica (Krick & Remington apud Pavesio *et al.*, 1992).

Em anos recentes, o parasita tem emergido como um importante patógeno oportunista em humanos e animais. Em humanos ele é frequentemente o agente causal de infecção entre dois grupos de indivíduos de alto risco: mulheres gestantes, onde *Toxoplasma* é associado com mal formações congênitas, quando a infecção primária é adquirida no primeiro trimestre de gestação e em pessoas imunossuprimidas que desenvolvem meningoencefalite, geralmente fatal (Kasper & Boothroyd, 1993).

Infecção congênita pode ocorrer quando uma mulher gestante torna-se infectada, ocorre parasitemia e o parasita atravessa a placenta e invade os tecidos do feto em desenvolvimento. Ao redor de 40% de crianças de mães infectadas tornar-se-ão infectadas, sendo que somente uma pequena proporção exibirá sintomas clínicos diretamente após o nascimento (Rothova, 1993). Entretanto, de acordo com um estudo realizado por Wilson *et al.* (1980), mais que 80% das crianças infectadas congênitamente desenvolvem sintomas clínicos neurológicos, tais como hidrocefalia, microcefalia, déficit intelectual, auditivo e visual como coriorretinite e outros. Toxoplasmose ocular é a doença infecciosa mais comum envolvendo a retina (Handerly *et al.*, 1987; Tabbara, 1990); pode promover a liberação de antígeno uveitogênico e exacerbar a reação inflamatória na retina por autoimunidade (Nussenblatt *et al.*, 1989). Ela compreende cerca de 50% de todas as uveites no Brasil, sendo esta observada frequentemente na região sul do país, onde a ingestão de carne de suíno crua contaminada é constante (Silveira *et al.*, 1988). De acordo com Perkins apud Rothova (1993), toxoplasmose ocular representa uma manifestação de doença congênita. No entanto, observações de Glasner *et al.* (1992), sobre um surto de toxoplasmose ocular em Erechim, no sul do Brasil, sugerem

que a infecção pode ser adquirida na vida pós-natal devido à baixa prevalência encontrada em crianças jovens.

A diminuição da imunidade pode levar a reativação de infecção crônica, como acontece em malignidades, transplante e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Jones *et al.*, 1986). A toxoplasmose é a causa mais comum de lesões cerebrais focais em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e se desenvolve em aproximadamente um terço daqueles que são soropositivos para *T. gondii* (Falangola & Petito, 1993). A encefalite por *Toxoplasma* tem sido relatada nos EUA em 1 a 5% dos pacientes com AIDS. No Brasil, este percentual varia de 9 a 13% (Lima, 1995).

1.14) RESPOSTA IMUNE AO *T. GONDII*

Em imunocomprometidos, *T. gondii* produz uma infecção aguda que pode levar à morbidade severa e elevada mortalidade. Em pacientes com AIDS, toxoplasmose aguda origina-se primariamente de reativação de infecção crônica com ruptura de cistos e subsequente liberação e multiplicação de taquizoítas. A reativação freqüentemente se apresenta clinicamente como encefalite ou lesões em massa do sistema nervoso central (Gazzinelli *et al.*, 1992).

O desenvolvimento de encefalite toxoplásmica em somente 30 a 40% de pacientes com AIDS e infecção latente, sugere uma base genética, o que tem sido observado em modelos experimentais murinos da doença (Hunter & Remington, 1994).

Em estudos desenvolvidos por Jones & Erb (1985), utilizando linhagens diferentes de camundongos, foi determinado que a resistência à infecção estava ligada a gens do complexo principal de histocompatibilidade H-2. Os camundongos com o haplotipo *d* ou *s* apresentavam menor número de cistos cerebrais. Camundongos infectados por via oral, que apresentam o

haplotipo H-2a apresentam menor número de cistos que aqueles com o haplotipo H2b, o locus *Bcg* no cromossomo 1 do camundongo também influencia o número de cistos embora de forma secundária (McLeod *et al.*, 1989). Conforme Abbas *et al.* (1994), os genes de classe I no camundongo estão nas regiões K, D e L. Gens localizados na região H-2 L, codificadores de moléculas de classe I, regulam o número de cistos cerebrais em camundongos infectados por via oral com *T. gondii*, sendo que os que apresentam o haplotipo L^d são resistentes e L^b susceptíveis (Brown & McLeod, 1990), os que apresentam o gen L^d têm menor carga cística e menor encefalite que aqueles sem o gen L^d (Brown *et al.*, 1995). Camundongos com os alelos *b* ou *k* da região H-2D, quando cronicamente infectados desenvolvem encefalite severa, com produção de maior número de cistos, enquanto aqueles com o alelo *d*, não, e o controle genético parece ser o mesmo tanto para infecção parenteral quanto para oral (Suzuki *et al.*, 1991). A susceptibilidade ao *T. gondii* regulada geneticamente, pode estar correlacionada com a quantidade de mRNA de IFN- γ , TNF- α e IL-6, produzida intracerebralmente. Comparando-se camundongos BALB e B10 congênicos na região do MHC, observa-se que animais que expressam maior quantidade destas citocinas, são melhor protegidos (Deckert-Schluter *et al.*, 1995). Como são as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I que apresentam antígenos para os linfócitos T CD8⁺, diferenças no desenvolvimento de encefalite toxoplásmica reguladas pela região H-2D, podem resultar de modos diferentes de ativação dos linfócitos T CD8⁺ (Brown & McLeod, 1990; Suzuki *et al.*, 1991).

Como para a maioria das infecções por protozoário, a toxoplasmose é acompanhada por desenvolvimento de ambas, resposta imune mediada por células e humoral (Sharma, 1990).

1.14.1) RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Em humanos infectados, anticorpos IgM podem ser detectados por diferentes métodos, como imunofluorescência indireta e ELISA, tão cedo quanto 7 dias após a infecção,

alcançar um título máximo em poucas semanas e gradualmente declinar em alguns meses. Anticorpos IgG aparecem geralmente em 1 a 2 semanas após a infecção alcançando títulos máximos em 6 semanas. Os títulos de IgG declinam gradualmente em alguns meses a anos e títulos baixos persistem comumente por toda a vida (Sharma, 1990). Apesar de anticorpos prevenirem reinfeção e disseminação do parasita durante infecção crônica, eles não são importantes em estabelecer imunidade (Goyal *et al.*, 1989).

1.14.2) RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS

A resposta imune mediada por células ao *T. gondii* representa o principal componente da imunidade do hospedeiro a este organismo. A indução de uma resposta proliferativa a antígenos de *Toxoplasma* é bem estabelecida. Linfócitos pré-sensibilizados de coelhos infectados com o parasita, sofrem transformação blástica na presença de antígeno parasitário. Em humanos, a resposta linfoproliferativa de indivíduos soropositivos é rotineiramente observada em muitos laboratórios (Kasper & Boothroyd, 1993).

Indivíduos saudáveis se protegem contra micróbios por meio de mecanismos da imunidade inata e específica. Atualmente tem se estabelecido uma importante inter-relação entre imunidade inata e específica, sendo que o desenvolvimento de diferentes subpopulações de linfócitos da imunidade específica é controlado pela imunidade inata no início da infecção. As principais células envolvidas na imunidade inata são células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos e células “Natural Killer” (Kaufmann, 1995).

A) Imunidade inata

As células “Natural Killer” (NK) têm sido identificadas como um possível mecanismo de atividade citotóxica contra *Toxoplasma*. Esta atividade é associada com uma elevação concomitante de títulos de IFN- γ no soro (Kasper & Boothroyd, 1993). Células NK

representam uma população distinta de linfócitos, são os chamados linfócitos grandes granulares, se originam da medula óssea e são ativados por IL-2, IL-12 e IFN- γ (Tizard, 1995). Administração de diferentes antígenos de *T. gondii* a camundongos imunocompetentes resultam em uma atividade de célula NK aumentada (Hauser *et al.*, 1983). Estas células podem matar diretamente o parasita *in vitro* (Hauser & Tsai, 1986). Uma pronta resposta de células NK, antes que outros efetores do sistema imune sejam ativados, pode resultar no aparecimento precoce de altos níveis de IFN- γ , que ativam mecanismos de defesa não específicos tais como macrófagos, células que são a primeira linha de defesa contra *T. gondii* (Hunter *et al.*, 1994). Hunter *et al.* (1994), estudando camundongos com a síndrome da deficiência imune combinada severa (segundo Tizard [1995] camundongos SCID não possuem células B ou T funcionais), infectados com *T. gondii*, observaram níveis elevados de IFN- γ no soro e atividade de células NK aumentada, mas não atividade citotóxica para células alvo infectadas com o parasita *in vitro*. Desde que não foi possível detectar atividade citotóxica aumentada para células alvo infectadas, parece provável que a principal atividade protetora de células NK neste modelo, é através da produção de IFN- γ (Denkers *et al.*, 1993a; Hunter *et al.*, 1994). As citocinas TNF- α e IL-12 produzidas por macrófagos e IL-2 produzida por células Th1 estimulam fortemente a produção de IFN- γ por células NK, sendo esta produção diminuída por IL-10 proveniente de macrófagos (Trip *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1994; Oppenheim & Neta, 1994). IL-10 provavelmente atue diminuindo a produção de TNF- α e IL-12, sendo esta inibição acentuada na ausência de IL-2. Durante infecção aguda por *T. gondii*, o parasita é um potente estimulador da liberação de IL-12 por macrófagos (Gazzinelli *et al.*, 1994a) (Figura 1).

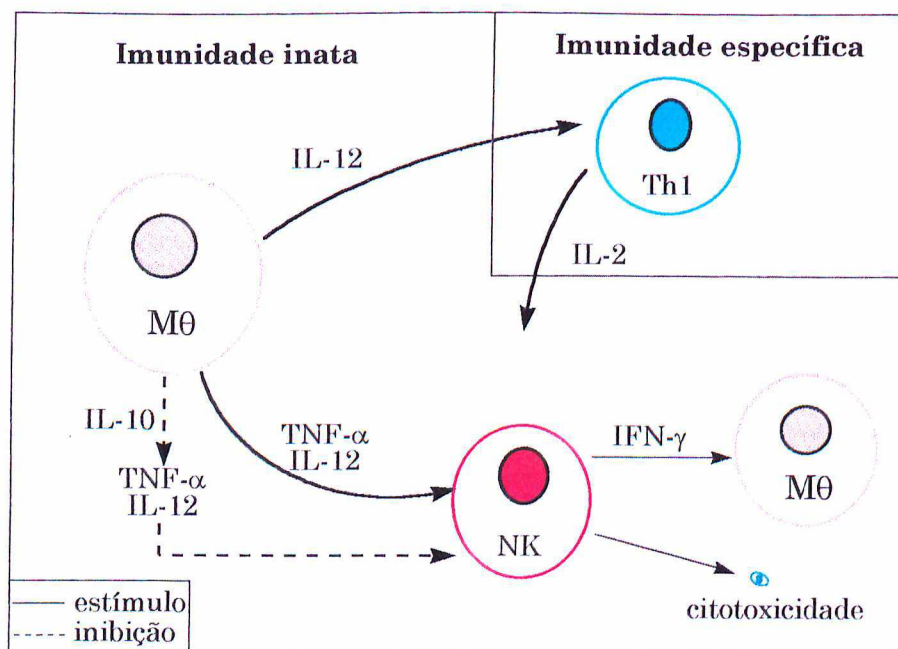


Figura 1 - Imunidade mediada por células NK ao *T. gondii*
(Adaptado de Kaufmann, 1995).

B) Imunidade específica

Ambas as células T helper $CD4^+$ e T citotóxicas $CD8^+$ são amplamente estudadas em toxoplasmose. Vollmer *et al.* (1987) observaram que camundongos infectados com *T. gondii* e que haviam sofrido depleção de linfócitos T $CD4^+$ produziam uma infecção severa que culminava com a morte em ambas, infecção aguda e crônica. A mortalidade em camundongos cronicamente infectados, foi associada à reativação da infecção, apesar dos altos títulos de anticorpo, e dano severo do sistema nervoso central.

Estudos em camundongos e subsequentemente em humanos identificaram duas subpopulações de linfócitos T “helper” $CD4^+$, Th1 e Th2, que mostram perfil diferente de secreção de citocinas (Mosmann *et al.*, 1986). Células Th1 que são geradas principalmente sob estimulação com patógenos intracelulares, produzem grandes quantias de IL-2 e IFN- γ , enquanto Th2, estimuladas com alérgenos ou antígenos helmínticos, produzem IL-4 e IL-5 (Street *et al.*, 1990). Células Th0 mostram um perfil irrestrito de produção de citocinas e

podem ser precursoras de Th1 e Th2. A subpopulação Th1 diferencia-se a partir de Th0, sob estímulos de citocinas e IL-12 produzida prematuramente por macrófago em uma infecção é um potente indutor de Th1 (McKnight *et al.*, 1994). Os efeitos de IL-12 são pleiotrópicos, além de estimular células NK, ela estimula também a proliferação e produção de citocinas por células T CD4⁺, T CD8⁺ e T $\gamma\delta$ (Scharton-Kersten *et al.*, 1995). Durante infecção aguda por *Toxoplasma*, IL-12 produzida por macrófagos infectados estimula células NK e induz a diferenciação de células T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , sendo estes efeitos importantes na sobrevivência do hospedeiro; entretanto, em animais cronicamente infectados, a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e T CD8⁺ é independente de IL-12 (Gazzinelli *et al.*, 1994a; Scharton-Kersten *et al.*, 1995).

Prigione *et al.* (1995) observaram que clones de células T humanas, derivadas do sangue periférico de dois indivíduos cronicamente infectados com *T. gondii*, apresentavam fenótipo CD4⁺ e produziam simultaneamente IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5 quando estimulados com mitógeno ou antígeno e foram classificados como T helper do tipo 0. A maioria destes clones quando estimulados *in vitro* com IL-4 ou IFN- γ , produziam IL-10, sugerindo que esta resposta Th0 pode limitar a magnitude da resposta imune ao parasita. Embora este perfil estável Th0 possa também ser devido a uma falta de estímulo do microambiente *in vivo*, que a faça se diferenciar em Th1 ou Th2.

IFN- γ é um importante mediador de resistência ao parasita (Suzuki *et al.*, 1988). Em experimentos realizados com camundongos BALB/c vacinados com uma cepa mutante de *T. gondii* sensível a temperatura (TS-4), observou-se resistência ao desafio letal com a cepa RH altamente virulenta e esta resistência foi dependente de IFN- γ (Gazzinelli *et al.*, 1991). Quando linfócitos destes animais foram estimulados *in vitro* com extrato antigênico total de *Toxoplasma*, as células T CD4⁺ produziram altos níveis de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2), mas

não Th2, isto está em desacordo com o trabalho de Prigione *et al.* (1995), que observaram um perfil Th0. Talvez esta diferença seja devido a espécies diferentes estudadas, provavelmente cepas diferentes do patógeno ou estímulos antigênicos *in vitro* diferentes. Gazzinelli *et al.* (1991) observaram também que células T CD8⁺ destes animais produziam *in vitro* menos IFN- γ e nenhuma IL-2 detectável. Contrariando Vollmer *et al.* (1987), quando estes animais sofreram depleção de células T CD4⁺, não apresentaram redução da imunidade. A depleção de células T CD8⁺ provocou uma diminuição na resistência, mas a depleção de T CD4⁺ e T CD8⁺ ou IFN- γ provocou uma total perda da resistência; resultados semelhantes foram observados por Johnson *et al.* (1995), utilizando camundongos irradiados. Estes resultados sugerem que embora células T CD4⁺ produzindo IFN- γ e IL-2 sejam induzidas pela vacinação, produção de IFN- γ pelas células T CD8⁺ são os principais efetores *in vivo*. Desta maneira, linfócitos T CD4⁺ provavelmente tenham um papel sinérgico através do aumento da síntese de IFN- γ por células T CD8⁺. Em novos experimentos, Gazzinelli *et al.* (1992) obtiveram resultados similares utilizando camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa de baixa virulência ME-49, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ atuam aditivamente ou sinérgicamente para prevenir reativação de infecção crônica, provavelmente através da produção de IFN- γ . Camundongos imunizados com homogenato da cepa RH desenvolvem imunidade quando desafiados com bradizoítas da cepa Beverly, sendo esta dependente de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Nagasawa *et al.*, 1991). Estes animais quando infectados com taquizoítas da cepa RH, dependem de células T CD8⁺ como efetoras finais e parece ser necessária a interação entre células T CD4⁺ e T CD8⁺, para o desenvolvimento das últimas.

Células de baço de camundongos BALB/c imunizados com cepa mutante sensível à temperatura são citotóxicas para células infectadas por *T. gondii*, sendo as células efetoras T CD8⁺, porque a citotoxicidade é significativamente diminuída quando se deleta estas células,

mas não quando se deleta células T CD4⁺ (Subauste *et al.*, 1991). Khan *et al.* (1991) obtiveram resultados semelhantes vacinando animais não singeneicos com o antígeno P30 e saponina Quil A como adjuvante. Os animais foram protegidos quando desafiados com cistos da cepa PLK, mas a imunidade protetora foi perdida quando estes sofreram depleção de célula T CD8⁺, mas não de célula T CD4⁺. Observaram também que as células T CD8⁺ foram diretamente parasitizadas contra *T. gondii* extracelulares. Esplenócitos de camundongos imunizados com antígeno P30 e Quil A apresentam atividade citotóxica para macrófagos de animais singeneicos infectados com as cepas RH, PLK, mas não para cepa PTgB (mutante deficiente em P30), e esta citotoxicidade é perdida quando se depleta o animal de células T CD8⁺ (Kasper *et al.*, 1992).

Linfócitos T CD8⁺ contribuem para controlar infecção aguda e crônica por *T. gondii*, sendo a atividade destas células muito relacionada à produção de IFN- γ (Denkers *et al.*, 1993b; Shirahata *et al.*, 1994). Entretanto não está claro se o linfócito T CD8⁺ induz proteção somente pela produção de IFN- γ , ou se a citocina sinergiza com a atividade citotóxica da célula. A hipótese mais favorável de atuação da célula T CD8⁺, é que ela provocaria a lise da célula infectada, liberaria taquizoítas de seu microambiente sequestrado e os parasitas livres seriam destruídos pelos macrófagos ativados por IFN- γ (Denkers *et al.*, 1993b). O esquema representativo da resposta imune acima citada está ilustrado na Figura 2.

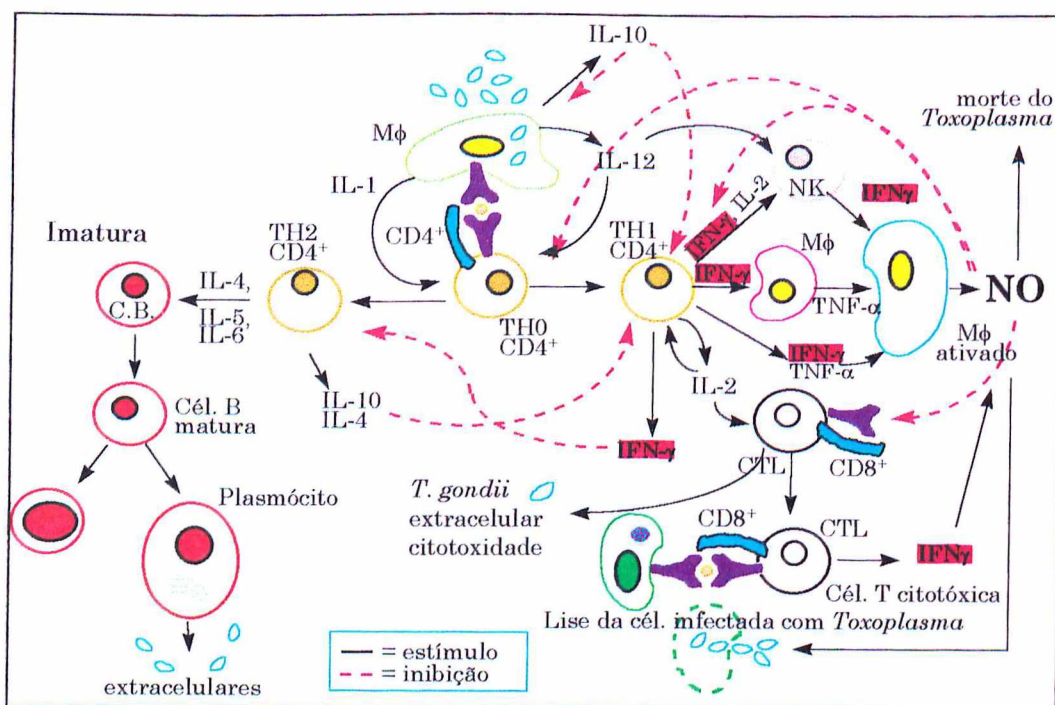


Figura 2 - Resposta imune ao *T. gondii* (Adaptado de Sharma, 1990)

Embora seja difícil extrapolar de modelo murino para o homem, estas evidências sugerem que a reativação de toxoplasmose em pacientes infectados por HIV pode não ser somente em função de uma diminuição de células T $CD4^+$ e é interessante notar que a maioria dos casos de toxoplasmose em pacientes HIV-positivos ocorre em estágios tardios da doença, quando uma deficiência na função de células T $CD8^+$ é também evidente (Gazzinelli *et al.*, 1992). Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa Fukaia e desafiados com o vírus da leucemia murina (MuLV) LP-BM5 morrem de 9 a 14 semanas após a infecção, enquanto camundongos infectados somente com *Toxoplasma* ou com o vírus são resistentes. A imunodeficiência de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ induzida pelo vírus da AIDS murina (MAIDS) é similar àquela que ocorre em infecção humana com o vírus HIV, sendo este, um bom modelo para se estudar encefalite toxoplásmica (Watanabe *et al.*, 1993).

1.14.3) MECANISMOS EFETORES MEDIADOS POR IFN- γ e TNF- α

Se IFN- γ é uma importante citocina mediando proteção, por quais mecanismos IFN- γ induziria esta proteção? O mecanismo principal parece ser por ativação de macrófago. Nathan *et al.* apud Beaman *et al.* (1992) citam o “burst” oxidativo como um importante mecanismo exercido pelos macrófagos ativados contra o parasita, mas a observação que macrófagos de pacientes com doença granulomatosa crônica são capazes de inibir o crescimento do parasita contesta esta hipótese. Um outro mecanismo vem de uma observação de Pfefferkorn *et al.* (1986), que IFN- γ inibe o crescimento de *T. gondii* em fibroblastos humanos por induzir degradação do triptofano da célula hospedeira (Beaman *et al.*, 1992). Provavelmente a geração de reativos intermediários do nitrogênio derivados de L-arginina seja o mais importante mecanismo de morte de *T. gondii* por macrófago murino ativado (Adams *et al.*, 1990). Experimentos *in vitro* têm mostrado a importante ação de IFN- γ e TNF- α na indução de sintase do óxido nítrico por macrófagos para controle do parasita (Sibley *et al.*, 1991; Langermans *et al.*, 1992). O óxido nítrico (NO) promove a inativação de enzimas críticas para replicação do DNA, enzimas que participam do ciclo do ácido cítrico e da respiração mitocondrial, sendo este efeito resultante da nitrosilação de grupos prostéticos Fe-S dentro de sítios ativos de enzimas alvo (Sher *et al.*, 1992).

O óxido nítrico é também importante em toxoplasmose ocular. A inibição de óxido nítrico em camundongos infectados por *T. gondii* resulta em um aumento de sintomas de inflamação ocular (Hayashi *et al.*, 1996a).

1.14.4) ENCEFALITE TOXOPLÁSMICA

O número de cistos no cérebro parece ser um dos fatores importantes que determinam o desenvolvimento de encefalite toxoplásmica (Suzuki *et al.*, 1993). A encefalite toxoplásmica

induzida ou ocorrendo naturalmente em camundongos susceptíveis C57BL/6 é associada com a função diminuída de macrófagos no sistema nervoso central (Gazzinelli *et al.*, 1993). Além de IFN- γ , TNF- α produzida endogenamente é importante para controle da infecção por *T. gondii*, através da indução da produção de óxido nítrico. Camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ME-49, desenvolvem uma meningoencefalite progressiva, que é inicialmente caracterizada pela presença ocasional de cistos e focos necróticos neuronais com infiltrado linfocítico (caracterizado principalmente de linfócitos T CD8⁺, segundo Gazzinelli *et al.* [1994b]) e microglial (Gazzinelli *et al.*, 1992). A progressão da doença culmina em grandes áreas necróticas, marcado infiltrado inflamatório, aparecimento de taquizoítas livres e elevada mortalidade, geralmente após 12 semanas de infecção. A neutralização de IFN- γ ou TNF- α destes animais quando cronicamente infectados (4 semanas), leva ao aparecimento de encefalite toxoplásmica associada à necrose aumentada, infiltrado neutrofílico e taquizoítas livres, uma expressão reduzida de sintase do óxido nítrico e mortalidade de todos os animais aos 9 a 12 dias de tratamento (Gazzinelli *et al.*, 1993).

Células da linhagem monócito/macrófago são morfológica, fenotípica e funcionalmente relacionadas às células microgliais. A micróglia manifesta um número de funções imunes que podem estar relacionadas à defesa do hospedeiro, incluindo expressão de moléculas MHC classe II, fagocitose de microorganismos, expressão de moléculas de adesão ICAM-1 (molécula de adesão intercelular), produção de citocinas e em roedores produção de grandes quantidades de óxido nítrico sob estimulação (Gehrmann *et al.*, 1995). A produção de óxido nítrico pela micróglia não é observada em humanos (Chao *et al.*, 1994). Células microgliais produzem citocinas tais como IL-1, IL-6, TNF- α e TGF- β 1 (Gehrmann *et al.*, 1995). Desde que a entrada no cérebro de células imunes é normalmente limitada pela barreira hematoencefálica, mecanismos específicos como a expressão de moléculas de adesão ICAM-1, antígenos do complexo principal de histocompatibilidade classe II no endotélio cerebral,

micróglia, endotélio e epitélio do plexo coróide são responsáveis pela entrada destas células em encefalite toxoplásmica (Deckert-Schluter *et al.*, 1994). A micróglia tem uma importante função na defesa do sistema nervoso central contra *Toxoplasma gondii* e citocinas produzidas por estas células podem participar desta atividade (Chao *et al.*, 1994). Estes autores estudaram células microgliais fetais humanas e as infectaram com a cepa RH de *T. gondii*, observaram que sob estimulação com IFN- γ /LPS elas reduzem o crescimento do parasita por impedir a penetração do mesmo nas células. Observaram que a ação conjunta das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 ativam a micróglia, sendo a fonte destas desconhecida, talvez células T infiltrantes.

Segundo Hunter *et al.* (1992), em modelos experimentais, o efeito do tratamento com citocinas recombinantes ou anticorpos neutralizantes para influenciar o curso da toxoplasmose é indireto no cérebro, pois estes não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, o que é contestado por Saija *et al.* (1995), que além da passagem de IL-1 α e β observaram também a passagem de IL-2 e IL-6, sendo as duas últimas promotoras do aumento da permeabilidade. Camundongos C57BL/10 altamente susceptíveis, infectados com a cepa RRA (Beverly), expressam mRNA no cérebro para citocinas associadas a monócitos, células microgliais e astrócitos, IL-6 aos 10 dias de infecção, TNF- α aos 15 dias (Hunter *et al.*, 1992). Citocinas associadas a células T, tais como GM-CSF são detectadas aos 15 dias, IL-4 (Th2) aos 10 dias, sendo esta provavelmente responsável pelo aparecimento do elevado número de cistos observados e, de acordo com Roberts *et al.* (1996), uma mortalidade reduzida no início da fase aguda da infecção, devido a sua regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias. Ainda segundo Hunter *et al.* (1992) transcritos para IFN- γ são detectados aos 15 dias pós-infecção e provavelmente são produzidos por célula T CD8⁺, pois IL-2 (Th1) é detectada somente aos 30 dias após a infecção.

1.15) REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE AO *T.GONDII*

Toda esta resposta imune acima citada é regulada negativamente pelo próprio sistema imune, pois ao contrário, haveria mais dano ao hospedeiro que benefício.

Na fase aguda da infecção ocorre uma supressão da resposta imune celular do hospedeiro pelo *T. gondii*, tanto em humanos quanto em modelos experimentais murinos (Khan *et al.*, 1995). A supressão é transitória e mediada por fatores solúveis. Aos 3 dias de infecção, observa-se a expressão de óxido nítrico e IFN- γ em esplenócitos de animais infectados e cultivados *in vitro*. Aos 7 dias, a expressão de óxido nítrico persiste e IFN- γ diminui, sendo detectado também níveis aumentados de IL-10 (Khan *et al.*, 1995). O óxido nítrico seria importante no equilíbrio da relação *T. gondii*-hospedeiro, pois ao mesmo tempo em que promove a morte do parasita, limita a proliferação de linfócitos (Candolfi *et al.*, 1995) e diminui a resposta inflamatória (Hayashi *et al.*, 1996b).

Na ausência de IL-10 endógena na fase aguda da infecção por *Toxoplasma*, camundongos apresentam patologia hepática aumentada e mortalidade acelerada. Estes efeitos são consequência de uma produção de IL-12 e IFN- γ bastante aumentadas, levando a uma imunopatologia, demonstrando que a regulação negativa induzida por IL-10 é importante para a sobrevivência do hospedeiro (Gazzinelli *et al.*, 1996).

A resposta linfoproliferativa associada a mitógeno ou antígeno parasitário é reduzida aos 7 dias de infecção ao mesmo tempo em que se observa uma redução na produção de IL-2 (Haque *et al.*, 1994; Kasper *et al.*, 1995). A imunossupressão observada aos 7 dias volta ao normal por volta de 21 dias em camundongos e esta regulação negativa é importante para reduzir lesões teciduais mediadas pelo sistema imune (Channon & Kasper, 1996).

1.16) RESPOSTA IMUNE POR CÉLULAS T $\gamma\delta$

Atualmente uma outra subpopulação de linfócitos é considerada ter um papel importante na proteção em toxoplasmose, são os linfócitos T com receptor de antígeno tipo $\gamma\delta$. Estas células podem ser de origem intratímica e extratímica e dependendo da sua origem e tempo de origem no desenvolvimento, vão povoar tecidos diferentes (Allison, 1993). Estas células são citotóxicas e produtoras de IL-2 quando ativadas (Tizard, 1995). São capazes de reconhecer antígenos não processados independentemente da apresentação por moléculas do MHC e são capazes de reconhecer proteínas de “stress” (Allison, 1993; Davis & Chien, 1995); esta representaria a primeira linha de defesa contra certas infecções. Esta subpopulação celular pode reconhecer e ser estimulada por proteínas de choque térmico de *Mycobacterium tuberculosis* e sob condições de estresse celular, proteína de “stress” da própria célula, então elas podem montar um mecanismo de defesa específico contra patógenos e por outro lado, podem iniciar ou amplificar reações imunes em sítios de agressão devido a sua reatividade a proteína de estresse autóloga (Rajasekar *et al.*, 1990).

Células T $\gamma\delta$ participam no mecanismo de defesa contra alguns patógenos, especialmente os intracelulares (Hisaeda *et al.*, 1996) e estas células estão aumentadas no sangue periférico de pacientes com toxoplasmose aguda (De Paoli *et al.*, 1992). O fato que a rota natural de infecção com *T. gondii* é através da ingestão oral, sugere que células T $\gamma\delta$ podem ser as primeiras células a interagirem com o parasita, pois estas estão presentes na mucosa intestinal (Subauste *et al.*, 1995). Células T $\gamma\delta$ funcionam como células citotóxicas ativadas por linfocinas quando ativadas por IL-2, podendo proteger contra morte em toxoplasmose aguda (De Paoli *et al.*, 1992). Segundo Nagasawa *et al.* (1994) e Hisaeda *et al.* (1995), células T $\gamma\delta$ têm um importante papel na expressão de proteína de “stress” (“heat

shock”) Hsp65 em macrófagos infectados com *T. gondii* e sua expressão é essencial para imunidade protetora à fase aguda da infecção (Nagasawa *et al.* 1992). Essa expressão aconteceria em animais infectados com a cepa Beverly, mas não em animais infectados com a cepa RH. Esta observação é contestada por Lyons & Johnson (1995), que observaram a expressão da proteína em macrófagos de animais infectados com a cepa RH, quando utilizaram métodos de quimiluminescência, que são mais sensíveis que os utilizados pelos autores acima citados. Os mecanismos envolvidos seriam: primeiro, os macrófagos seriam ativados pelas células T $\gamma\delta$, provavelmente através de certas citocinas, não apenas IFN- γ , mas está em associação com outras (IL-2, segundo Polla & Kantengwa, 1991); o macrófago ativado exibiria um “burst” respiratório aumentado, gerando os metabólitos do oxigênio e mais recentemente, óxido nítrico, segundo Hisaeda *et al.* (1996). O macrófago ativado sintetizaria Hsp65 para proteção contra estas moléculas tóxicas, para reparar funções celulares prejudicadas (Polla, 1991) e para apresentação efetiva de antígenos (Hisaeda *et al.*, 1995).

Células T $\gamma\delta$ extratímicas estimulam a expressão de Hsp65 em macrófagos peritoneais murinos infectados com a cepa Beverly, tornando-os relativamente resistentes à infecção, sendo que células T $\gamma\delta$ intratímicas não têm o mesmo efeito (Hisaeda *et al.*, 1996). Estes autores observaram também que camundongos BALB/c tornam-se extremamente susceptíveis à infecção quando sofrem depleção de células T $\gamma\delta$, apesar do aumento em números absolutos de células T $\alpha\beta$. Esta Hsp65, expressa em macrófagos prematuramente durante infecção, induzida por células T $\gamma\delta$ extratímicas, estimularia células T $\gamma\delta$ intratímicas. Células T $\gamma\delta$ produzem IL-2, TNF- α , mas não IL-4 quando incubadas com células infectadas com *T. gondii* e são citotóxicas para células infectadas com o parasita (Subauste *et al.*, 1995).

Estudos têm demonstrado a existência de células T $\alpha\beta$ reativas a Hsp65, indicando que esta proteína derivada do macrófago hospedeiro ou parasita fornece uma ligação entre esta

subpopulação celular e a subpopulação $\gamma\delta$ (Koga *et al.*, 1989). Foi verificado que macrófagos ativados por IFN- γ ou infecção viral expressam Hsp que é reconhecida por células T CD8⁺, então apresentadas por moléculas do MHC classe I (Figura 3).

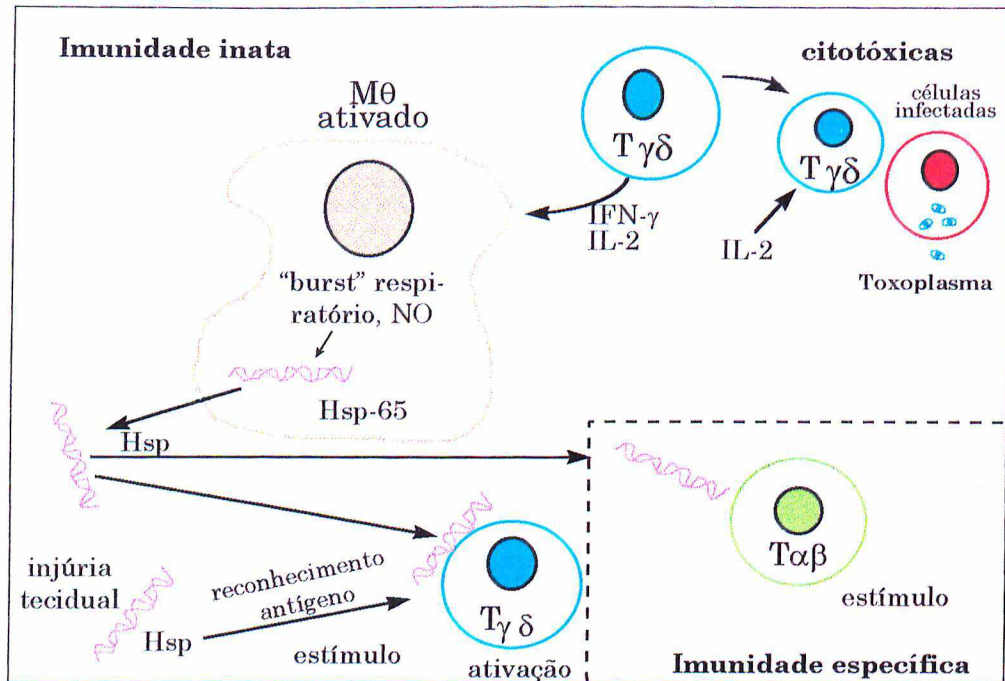


Figura 3- Imunidade mediada por células T $\gamma\delta$ ao *T. gondii* (Adaptado de Kaufmann, 1995).

Exposição de macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro* a Hsp65 micobacteriana induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e óxido nítrico que inibem a proliferação celular de *T. gondii* independente de células T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (Peetermans *et al.*, 1995).

1.17) PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsps)

Hsps estão entre as proteínas mais evolucionariamente conservadas. Elas são classificadas de acordo com sua massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida

(SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Exposição de qualquer célula viva ou organismo a estresse ambiental, incluindo temperatura elevada, estresse químico, deficiência nutricional ou injúria oxidativa resulta na transcrição de um grupo de genes altamente conservados e a síntese das proteínas de “stress”. Hsp70 é importante na interação proteína-proteína; ela se liga a proteína anormal, desenovelada, desnaturada, levando-a para o compartimento celular definitivo (funcionam como “chaperones”) onde estas sofrem o processamento normal (Polla, 1991). Estas proteínas anormais podem ocorrer após aquecimento ou exposição a radicais livres. Quando intracelularmente expressas, elas participam na eliminação do patógeno atuando no mecanismo de discriminação do próprio e não próprio (Forsdyke, 1985); são importantes também no processamento e apresentação de antígeno através do auxílio na associação peptídeo e antígeno Ia (MHC II) (Vanbuskirk *et al.*, 1989).

Hsps parasitárias parecem ter um importante papel em adaptação ao hospedeiro mamífero durante infecção e diferenciação do parasita, enquanto, por outro lado, funcionam como proeminentes proteínas antigênicas (Polla, 1991). Durante seu ciclo de vida, alguns parasitas são expostos a grandes diferenças de temperatura, na passagem de vetores invertebrados para hospedeiros mamíferos homeotérmicos. A diferença de temperatura entre os hospedeiros (25° e 37°C) podem induzir resposta de choque térmico em parasitas (Maresca & Carratú, 1992). Formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* expressam 25 a 100 vezes mais transcritos de genes de proteína de “stress” que os estágios dos insetos, em *Leishmania major* a mudança de temperatura induz diferenciação de promastigotas para amastigotas (Van Der Ploeg *et al.*, 1985). Proteínas de “stress” podem ser importantes na diferenciação de muitos parasitas incluindo *Schistosoma mansoni* (Newport *et al.*, 1988). Hsps70 de *Plasmodium falciparum*, são detectadas em estágio intra-eritrocítico do parasita, mas não em merozoítas livres (Polla, 1991). Hsps parasitárias parecem ser potentes imunógenos, sugerindo haver uma

falta de homologia suficiente entre as Hsps do parasita e hospedeiro para permitir resposta imune específica do hospedeiro às Hsps do parasita (Selkirk *et al.*, 1989).

Existem diferenças na expressão de Hsps entre taquizoítas de cepas virulentas e avirulentas de *T. gondii*, as cepas virulentas obtidas de cultivo *in vivo* expressam as proteínas de 65 e 70 kDa, enquanto que as cepas avirulentas somente a de 65 kDa (Lyons & Johnson, 1995). Estes autores observaram que a expressão de Hsp70 é induzida por estresse imunológico associado com o hospedeiro murino e que ela não é expressa nos parasitas que infectam hospedeiros imunocomprometidos, estas conclusões vêm do fato de que quando se imunossuprime o animal infectado com a cepa RH, com acetato de cortisona não se observa a expressão da proteína de 70 kDa. Em cultivo *in vitro* de cepas virulentas e avirulentas foi observada a expressão da proteína de 65, mas não a de 70 kDa, sugerindo que a proteína de 65 kDa é expressa constitutivamente no estágio de taquizoíta (Lyons & Johnson, 1995).

Objetivos

2) OBJETIVOS

Uma questão importante no controle da toxoplasmose é o desenvolvimento de uma vacina ou medicamentos que confirmem proteção ao hospedeiro; para isto, é necessário que se investigue os vários aspectos da biologia celular e molecular do parasita. A identificação de diferenças e similaridades entre diferentes cepas isoladas de humanos e animais se constitui em elemento de grande relevância. Diferenças entre cepas são caracterizadas predominantemente pela capacidade destas em provocar doença mais ou menos grave em camundongos. Já é bem documentado que cepas diferentes de *T. gondii* compartilham antígenos comuns, mas experimentos para tais conclusões foram realizados *in vitro*.

Conhecer-se as causas e momento da interconversão de estágio do parasita seria também de fundamental importância para tratamento e prevenção da doença em imunocomprometidos.

Outro ponto importante é entender melhor a resposta imune ao parasita e a subpopulação de células T $\gamma\delta$ atualmente está emergindo como um componente de grande importância na resposta imune frente ao *T. gondii*. Estas células são habitantes naturais da mucosa intestinal, principal porta de entrada de *Toxoplasma* e são capazes de reconhecer proteínas de choque térmico.

No presente estudo utilizou-se camundongos C57BL/6, infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção ou não de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, ou foram neutralizados de IFN- γ ou TNF- α , com os seguintes objetivos:

A) Padronização da reação de imunocitoquímica para detecção de antígenos de *T. gondii*.

B) Verificar a presença a partir de um modelo de infecção experimental *in vivo*, de antígenos compartilhados entre a cepa ME-49 e as cepas PLK, PTgB, PJA, RH e CEP.

C) Verificar a ocorrência ou não de interconversão de estágio, através da pesquisa de antígenos dos estágios de bradizoíta e taquizoíta (P30 e P22) de *T. gondii* nos cistos cerebrais de camundongos e o padrão de marcação à medida que o animal se torna imunocomprometido.

D) Observar o efeito do déficit do sistema imune sobre o tamanho e número de cistos cerebrais.

E) Verificar a presença de antígenos de oocisto/esporozoíto nos cistos cerebrais.

F) Verificar a expressão de proteína de choque térmico de 70 kDa nos parasitas encistados.

Material e Métodos

3) MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregados cérebros de camundongos cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* incluídos em blocos de parafina, gentilmente cedidos pelo Dr. Ricardo T. Gazzinelli.

3.1) INFECÇÃO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

GRUPO 1:

Camundongos fêmeas, C57BL/6 de 4 a 5 semanas de idade, foram infectados intraperitonealmente com 10 a 20 cistos da cepa de baixa virulência ME-49 de *T. gondii*. Um mês após a infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 0,5 mg de anticorpo monoclonal 2,43 (IgG2a) de rato anti-CD8⁺ de camundongo e/ou 0,5 mg de anticorpo monoclonal GK 1,5 (IgG2a) de rato anti-CD4⁺ de camundongo por 3 dias consecutivos, com doses adicionais a cada 3 dias durante todo o experimento. Camundongos infectados controle, foram inoculados por via intraperitoneal com a mesma dose anterior com anticorpo monoclonal GL113 (IgG1) de rato anti- β -galactosidase.

Para comprovar a eficácia da depleção, células de baço dos animais tratados foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD4⁺ e anticorpo monoclonal anti-CD8⁺.

GRUPO 2:

Camundongos fêmeas, C57BL/6 de 4 a 5 semanas de idade, infectados da mesma forma que os animais do grupo 1, sofreram neutralização para IFN- γ ou TNF- α . Um mês após

a infecção foram tratados por via intraperitoneal com 3mg de anticorpo monoclonal XMG6 (IgG1) de rato anti-IFN- γ de camundongo ou 3mg de anticorpo monoclonal HT-11-22 (IgG1) de rato anti-TNF- α de camundongo, semanalmente durante todo experimento. Camundongos infectados controle foram inoculados por via intraperitoneal com a mesma dose anterior com anticorpo monoclonal GL 113 (IgG1) de rato anti- β -galactosidase.

Em cada condição de imunossupressão, foram utilizados sempre três animais.

3.2) FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Os animais tratados com anticorpo monnclonal controle ou que sofreram depleção de célula T CD4⁺ ou T CD8⁺ foram mortos por deslocamento cervical aos 20 dias após o início do tratamento imunossupressivo, enquanto que os animais que sofreram depleção de célula T CD4⁺ e T CD8⁺ foram mortos 10 dias após o início do tratamento. Os cérebros foram coletados, fixados em formol tamponado a 10% e posteriormente incluídos em parafina.

Os animais do grupo 2 neutralizados de IFN- γ foram mortos em câmara de CO₂ e decapitados, sendo o cérebro coletado aos 1, 3, 5, 7, 9, 10 e 12 dias após o início do tratamento imunossupressivo. Os animais neutralizados de TNF- α foram sacrificados aos 12 dias, da mesma forma que os neutralizados de IFN- γ . Após a coleta, os cérebros foram fixados em Bouin-Hollande por 24 horas, transferidos para etanol a 70% e posteriormente incluídos em parafina.

Foram feitos cortes de 4 μ m de espessura em micrótomo Spencer 820, sendo estes fixados em lâminas contendo substância aderente de PVC.

3.3) ANTISOROS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA

Para detecção de antígenos de taquizoíta e oocisto de *Toxoplasma* foram utilizados antisoros policlonais produzidos em coelhos. Também para detecção de antígenos da cepa altamente virulenta RH (Sabin, 1941), PLK (cepa PTg, atualmente P Lloyd Kasper) um clone derivativo da ME-49 (Ware & Kasper, 1987), PTgB cepa mutante deficiente em P30 (Kasper *et al.*, 1992) e cepa CEP originária de um filhote de gato naturalmente infectado (Ware & Kasper, 1987), foram utilizados antisoros policlonais produzidos em coelhos imunizados com taquizoítas de cada cepa.

O antisoro anti-Hsp70 foi produzido em coelho e gentilmente fornecido pelo Dr. Antônio Gomes de Amorim Filho da Universidade Federal de São Paulo. Para produção deste anticorpo, o clone 133P foi selecionado a partir de um banco de cDNA da forma promastigota de *L. (V.) braziliensis*; este codifica os três quartos C-terminais de uma proteína pertencente a família das Hsps70. Esta região é a mais polimórfica desta proteína, na qual presumivelmente, estão localizados os epítomos imunodominantes e espécie específicos. A proteína codificada por este clone foi utilizada para imunizar coelhos.

3.3.1) OBTENÇÃO DE ANTISORO ANTI-CEPA PJA

Camundongos BALB/c foram infectados intraperitonealmente com cistos da cepa PJA (Kaneto *et al.*, in press) isolada de um cão. Esta cepa é mantida em laboratório por infecção crônica de camundongos e o inóculo é obtido a partir de macerado cerebral de camundongo cronicamente infectado. Após um período de 40 a 60 dias de infecção, o soro dos animais infectados foi coletado, por punção retro-orbital.

3.4) REAÇÃO DE ELISA PARA DEFINIR A DILUIÇÃO DOS ANTISOROS PRIMÁRIOS A SEREM UTILIZADOS NA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA

3.4.1) REAÇÃO DE ELISA PARA DEFINIÇÃO DA DILUIÇÃO DOS ANTISOROS PRODUZIDOS EM COELHO

A reação foi realizada conforme Mineo *et al.* (1980) com modificações. Microplacas de polivinil cloreto com fundo em U, foram sensibilizadas com 2,5µg/ml de extrato solúvel de taquizoíta da cepa RH de *T. gondii*, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6 (50µl/poço), a 4°C durante uma noite.

As placas sofreram 3 lavagens em salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15 M pH 7,2 adicionado de Tween 20 (Polyoxiethylene Sorbitan, Sigma Chemical Co., USA) 0,1% durante 5 minutos cada. Diluições de 1:50 até 1:6400 de cada antisoro, foram adicionadas em cada poço sequencialmente, juntamente com amostras-padrão negativas constituídas de soro de coelho normal e as placas foram incubadas a 37°C durante 45 minutos. Após esta incubação, as placas foram novamente lavadas em PBS Tween 0,1% durante 5 minutos, por 3 vezes.

A seguir as placas foram incubadas a 37°C durante 45 minutos com o conjugado imunoenzimático, constituído de antisoro de cabra anti-coelho marcado com peroxidase (Sigma Co. St Louis - MO, USA), na diluição de 1:20000. Após incubação e lavagens nas mesmas condições acima citadas, adicionou-se o substrato enzimático constituído por 5mg de OPD (1,2 - Phenylendiamin - Merck - Schuchardt, Alemanha) diluído em 12,5ml de tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 e 5µl de H₂O₂ 30% adicionada no momento do uso. A reação enzimática foi interrompida após 10 minutos pela adição de ácido sulfúrico 2N e a reatividade

foi avaliada pela determinação dos valores em absorbância a 492nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus MK II - type 314).

3.4.2) REAÇÃO DE ELISA PARA DEFINIÇÃO DA DILUIÇÃO DO ANTISORO PRODUZIDO EM CAMUNDONGO

Microplacas de poliestireno sensibilizadas como previamente citado, sofreram 3 lavagens em salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15M pH 7,2 adicionado de Tween 20 (Polyoxiethylene Sorbitan, Sigma Chemical Co., USA) 0,1% durante 5 minutos cada. Antiseros de camundongo anti-cepa PJA na diluição de 1:64 a 1:8000 foram adicionados em cada poço sequencialmente, juntamente com os padrões negativos constituídos de soro de camundongo normal, as placas foram então incubadas a 37°C durante 45 minutos. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas em PBS Tween 0,1% durante 5 minutos, por 3 vezes, sendo a seguir incubadas a 37°C durante 45 minutos com o conjugado imunoenzimático, IgG de coelho anti- γ de camundongo marcada com peroxidase, na diluição de 1:1000. Após incubação e lavagens nas mesmas condições acima citadas, adicionou-se o substrato enzimático constituído por 5mg de OPD (1,2 - Phenylendiamin - Merck - Schuchardt, Alemanha) diluído em 12,5ml de tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 e 5 μ l de H₂O₂ 30% adicionada no momento do uso. A reação enzimática foi interrompida após 10 minutos pela adição de H₂SO₄ 2N e a reatividade foi avaliada pela determinação dos valores em absorbância a 492nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus MK II - type 314).

3.5) PREPARO DO ANTISORO SECUNDÁRIO ANTI-COELHO PARA SER UTILIZADO NAS REAÇÕES DE IMUNOCITOQUÍMICA

3.5.1) DOSAGEM PROTEICA DE γ -GLOBULINA DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO

A dosagem protéica da fração γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se como padrão de referência a albumina bovina fração V (Sigma Co., USA).

3.5.2) BIOTINILAÇÃO DE γ -GLOBULINA DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO

A conjugação foi realizada conforme Coligan *et al.* (1994). N-hidroxisuccinimida biotina éster foi dissolvida em dimetilsulfóxido (10mg/ml). A fração γ -globulina de carneiro foi diluída em tampão borato de sódio 0,1M pH 8,8, na concentração de 3mg/ml. Após as diluições a biotina éster foi adicionada ao anticorpo na proporção de 250 μ g por miligrama de anticorpo. Esta solução foi incubada a temperatura ambiente, durante 4 horas sob agitação lenta.

Após este tempo foi adicionada solução de Cloreto de Amônio (NH_4Cl), na proporção de 20 μ l/250 μ g de biotina éster, seguindo nova incubação de 10 minutos a temperatura ambiente.

Esta solução foi então dialisada contra salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15M pH 7,2 por 48 horas a 4°C, para remoção da biotina não conjugada ao anticorpo.

3.5.3) ELISA PARA DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO ANTISORO SECUNDÁRIO

Microplacas de poliestireno sensibilizadas como previamente mencionado, sofreram 3 lavagens em salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15M pH 7,2 adicionado de Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan, Sigma Chemical Co., USA) 0,1% durante 5 minutos cada. Antisoro de coelho anti-cepa RH (titulação conhecida) nas diluições de 1:200 a 1:600 foi adicionado em cada poço sequencialmente, juntamente com os padrões negativos constituídos de soro de coelho normal; as placas foram então incubadas a 37°C durante 45 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas conforme descrito acima e novamente incubadas a 37°C durante 45 minutos com o conjugado imunoenzimático, γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho biotilada, nas diluições de 1:100 a 1:3200. Após incubação e lavagens nas mesmas condições acima citadas, a reação foi amplificada durante 30 minutos a 37°C, com o sistema avidina - biotina - peroxidase (Vectastain ABC kit - PK-4000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA), diluído na proporção de 1:100 em PBS. Foram feitas outras 3 lavagens em PBS adicionado de Tween 20 0,1% durante 5 minutos cada e adicionou-se o substrato enzimático constituído por 5mg de OPD (1,2 - Phenylendiamin - Merck - Schuchardt, Alemanha) diluído em 12,5ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 μ l de H₂O₂ 30% adicionada no momento do uso. A reação enzimática foi interrompida após 10 minutos pela adição de H₂SO₄ 2N e a reatividade foi avaliada pela determinação dos valores em absorbância a 492nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus MK II - type 314).

3.6) PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA

3.6.1) REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO O ANTISORO SECUNDÁRIO DE CABRA ANTI-COELHO MARCADO COM PEROXIDASE

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

Os cortes teciduais foram desparafinados em xilol durante 30 minutos a 40 - 50°C e a seguir em xilol durante 15 minutos à temperatura ambiente; foram rehidratados em álcoois de concentrações decrescentes (100, 90, 80% durante 3 minutos cada e 70% durante 10 minutos) e água corrente durante 3 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito, em três incubações de 3 minutos cada e uma incubação de 5 minutos com peróxido de hidrogênio a 3%. Procedeu-se uma lavagem em água corrente durante 10 minutos, tempo em que se circundou os cortes com esmalte para contenção e economia de reagentes e, a seguir, as lâminas foram imersas em salina tamponada com fosfato (PBS), durante 5 minutos.

Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro normal da mesma espécie que o antisoro secundário, soro de cabra normal a 2%, durante 20 minutos a 37°C, diluído em PBS.

Após este tempo as lâminas foram incubadas durante toda a noite, a 4°C com antisoro primário, coelho anti-cepa RH, diluído em PBS na diluição 1:1000 definida pelo teste de ELISA descrito anteriormente.

Como controle da reação utilizou-se soro de coelho não imune na mesma diluição do antisoro primário.

Após incubação com o antisoro primário, as lâminas foram aclimatadas, durante 30 minutos à temperatura ambiente e foram a seguir imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

O antisoro secundário utilizado, foi soro de cabra anti-coelho marcado com peroxidase (Sigma), nas diluições de 1:2000, 1:4000 e 1:8000 em PBS. As lâminas foram incubadas com este antisoro durante 30 minutos a 37°C; logo após, estas foram imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

A reação foi revelada com uma solução cromógena, filtrada, que consistiu de 2,5mg de DAB-Sigma (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride - Sigma), 5ml de PBS e 6,0µl de peróxido de hidrogênio 100 vol. (30%) adicionado no momento do uso.

As lâminas, cujo fixador utilizado foi formol, foram incubadas por 5 minutos, mas as que foram fixadas com Bouin-Hollande foram incubadas com a solução reveladora por 3 minutos e 45 segundos. Completado o tempo de permanência nesta solução, as lâminas foram imediatamente imersas em água corrente e lá permaneceram por 5 minutos.

A contracoloração foi feita em hematoxilina de Meyer's, durante 10 minutos à temperatura ambiente; a seguir, desprezou-se o excesso do corante e fez-se a diferenciação em hidróxido de amônio por mais 10 minutos. Finalizada a reação, retirou-se o esmalte e procedeu-se à desidratação em álcoois de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante 3 minutos cada e depois 1 banho de xilol/álcool (v/v) por 1 minuto e xilol por 1 minuto. As lâminas foram montadas em lamínula e Entelam.

3.6.2) REAÇÕES DE IMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO O ANTISORO SECUNDÁRIO DE CARNEIRO ANTI-COELHO BIOTINILADO E AMPLIFICAÇÃO COM KIT ABC

Para padronização da reação, utilizou-se antisoro primário de coelho anti-cepa RH. Após definição da reação ideal, os diversos soros de coelho foram utilizados conforme título definido pelo teste ELISA e reações piloto de imunocitoquímica. Sempre como controle da reação utilizou-se antisoro de coelho não imune, na diluição do antisoro primário.

3.6.2.1) REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA

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

O processo de desparafinização dos cortes e bloqueio da peroxidase endógena foram realizados conforme descrito para o item 3.6.1.

Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação as lâminas foram incubadas com soro normal da mesma espécie que o antisoro secundário, soro de carneiro normal a 2%, durante 20 minutos a 37°C, diluído em PBS.

Após este tempo as lâminas foram incubadas durante toda a noite, a 4°C com antisoro primário, soro de coelho anti-cepa RH diluído em PBS na diluição 1:1000 definida pelo teste de ELISA descrito anteriormente.

Como controle da reação utilizou-se soro de coelho não imune na mesma diluição do antisoro primário.

Após incubação com o antisoro primário, as lâminas foram aclimatadas, durante 30 minutos à temperatura ambiente e foram a seguir imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

O antisoro secundário utilizado foi dependente do antisoro primário; quando se utilizou antisoro primário produzido em coelho, o antisoro secundário foi γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho biotinilada, nas diluições de 1:2000 e 1:4000 em PBS. As lâminas foram incubadas com este antisoro, durante 30 minutos a 37°C; logo após, estas foram imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

A reação foi amplificada com o complexo avidina - biotina - peroxidase (Vectastain ABC Kit - PK-4000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA). Este kit consiste de avidina ligada a peroxidase biotinilada. Este reagente retém um sítio de ligação para biotina proveniente do anticorpo secundário (Figura 4). O complexo ABC foi diluído 1:100, e as lâminas foram incubadas nesta solução durante 30 minutos a 37°C. Após este período foram imersas em PBS por 2 vezes como anteriormente citado.

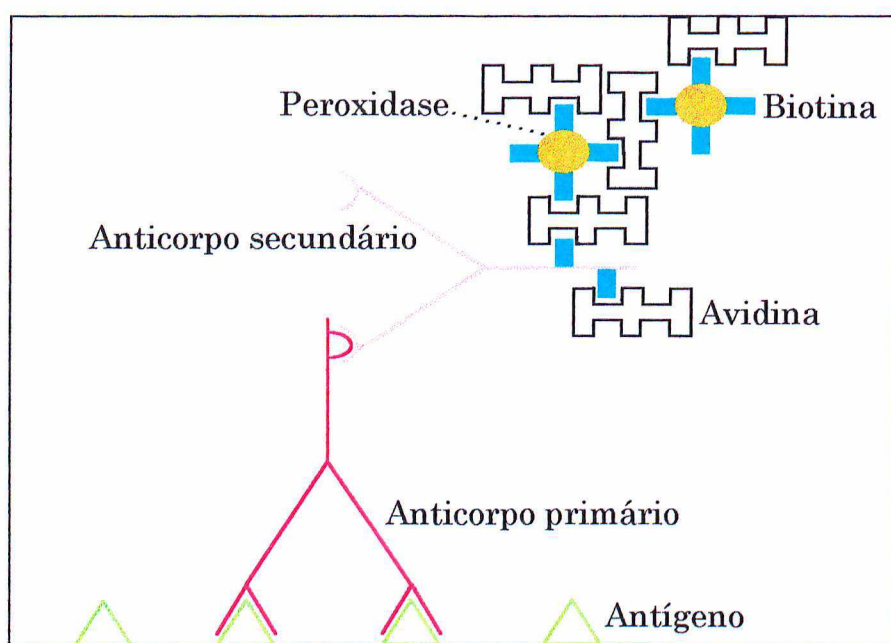


Figura 4 - Complexo avidina - biotina - peroxidase (Adaptado de Gosselin *et al.*, 1986)

A reação foi revelada com uma solução cromógena, filtrada, que consistiu de 2,5mg de DAB-Sigma (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), 5ml de PBS e 6,0μl de peróxido de hidrogênio 100 vol. (30%) adicionado no momento do uso.

As lâminas cujo fixador utilizado foi formol, foram incubadas por 5 minutos, mas as que foram fixadas com Bouin-Hollande foram incubadas com a solução reveladora por 3 minutos e 45 segundos. Completado o tempo de permanência nesta solução, as lâminas foram imediatamente imersas em água corrente e lá permaneceram por 5 minutos.

A contracoloração foi feita em hematoxilina de Meyer's, durante 10 minutos à temperatura ambiente, a seguir desprezou-se o excesso do corante e fez-se a diferenciação em hidróxido de amônio por mais 10 minutos. Finalizada a reação, retirou-se o esmalte e procedeu-se a desidratação em álcoois de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante 3 minutos cada e depois 1 banho de xilol/álcool (v/v) por 1 minuto e xilol por 1 minuto. As lâminas foram montadas em lamínula e Entelam.

3.6.2.2) REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA COM RESGATE ANTIGÊNICO COM TRIPSINA

O processo de desparafinização dos cortes e bloqueio da peroxidase endógena foram realizados conforme descrito para o item 3.6.1.

As lâminas foram incubadas com solução de tripsina (Sigma) 0,1% pH 7,6 previamente aquecida a 37°C, durante 15 minutos a 37°C para resgate de sítios antigênicos (Battifora & Kopinski, 1986). Após o resgate, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 10 minutos e foram imersas em PBS durante 5 minutos por 2 vezes.

Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro normal da mesma espécie que o antisoro secundário; neste caso, as lâminas foram incubadas com soro de carneiro normal a 2%, durante 20 minutos a 37°C, diluído em PBS.

Após este tempo as lâminas foram incubadas, durante toda a noite, a 4°C com antisoro primário, antisoro de coelho anti-cepa RH diluído em PBS na diluição 1:1000 definida no teste de ELISA descrito anteriormente.

Como controle da reação utilizou-se soro de coelho não imune na mesma diluição do antisoro primário.

Após incubação com o antisoro primário, as lâminas foram aclimatadas, durante 30 minutos à temperatura ambiente e foram a seguir imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

O antisoro secundário utilizado foi γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho biotinilada, na diluição de 1:2000 em PBS. As lâminas foram incubadas com o antisoro secundário, durante 30 minutos a 37°C; logo após, estas foram imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

A reação foi amplificada com o complexo ABC na diluição 1:100. As lâminas foram incubadas nesta solução durante 30 minutos a 37°C. Após este período foram imersas em PBS por 2 vezes como anteriormente citado.

A reação foi revelada com uma solução cromógena, filtrada, que consistiu de 2,5mg de DAB-Sigma (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), 5ml de PBS e 6,0 μ l de peróxido de hidrogênio 100 vol. (30%) adicionado no momento do uso.

As lâminas cujo fixador utilizado foi formol, foram incubadas por 5 minutos, mas as que foram fixadas com Bouin-Hollande foram incubadas com a solução reveladora por 3 minutos e 45 segundos. Completado o tempo de permanência nesta solução, as lâminas foram imediatamente imersas em água corrente e lá permaneceram por 5 minutos.

A contracoloração foi feita em hematoxilina de Meyer's, durante 10 minutos à temperatura ambiente, a seguir desprezou-se o excesso do corante e fez-se a diferenciação em hidróxido de amônio por mais 10 minutos. Finalizada a reação, retirou-se o esmalte e

procedeu-se a desidratação em álcoois de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante 3 minutos cada e depois 1 banho de xilol/álcool (v/v) por 1 minuto e xilol por 1 minuto. As lâminas foram montadas em lamínula e Entelam.

3.6.2.3) REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO RESGATE ANTIGÊNICO EM FORNO MICROONDAS E ABSORÇÃO DO ANTISORO PRIMÁRIO COM SORO DE CAMUNDONGO NORMAL

O processo de desparafinização dos cortes e bloqueio da peroxidase endógena foram realizados conforme descrito para o item 3.6.1.

A seguir, o resgate de sítios antigênicos foi feito em forno microondas Sharp (Sharma *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1991), potência máxima (700 watts). As lâminas foram imersas em tampão citrato constituído de 2,1g de ácido cítrico anidro (CAAL), 1 litro de água destilada e NaOH 2M até atingir o pH 6,0 e foram realizados 2 ciclos de 5 minutos e 2 ciclos de 4 minutos, com intervalo de 1 minuto entre cada ciclo. As lâminas foram aclimatadas durante 20 minutos à temperatura ambiente, lavadas em água corrente durante 10 minutos, tempo em que os cortes foram circundados com esmalte e foram imersas em PBS como acima citado.

Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro normal da mesma espécie que o antisoro secundário, soro de carneiro normal a 2% durante 20 minutos a 37°C, diluído em PBS.

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-cepa RH diluído em PBS previamente absorvido com soro de camundongo normal a 2%, para minimizar reações inespecíficas. A diluição do antisoro primário dependeu do título obtido no teste de ELISA descrito anteriormente.

Como controle da reação, utilizou-se soro de coelho não imune na diluição do antisoro primário e também absorvido em soro de camundongo normal a 2%.

Após incubação com o antisoro primário, as lâminas foram aclimatadas, durante 30 minutos à temperatura ambiente e foram a seguir imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

O antisoro secundário utilizado foi γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho biotinizada, na diluição de 1:2000 em PBS. As lâminas foram incubadas com o antisoro secundário, durante 30 minutos a 37°C; logo após, estas foram imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

A reação foi amplificada com o complexo ABC na diluição 1:100. As lâminas foram incubadas nesta solução durante 30 minutos a 37°C. Após este período foram imersas em PBS por 2 vezes como anteriormente citado.

A reação foi revelada com uma solução cromógena, filtrada, que consistiu de 2,5mg de DAB-Sigma (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), 5ml de PBS e 6,0 μ l de peróxido de hidrogênio 100 vol. (30%) adicionada no momento do uso.

As lâminas cujo fixador utilizado foi formol, foram incubadas por 5 minutos, mas as que foram fixadas com Bouin-Hollande foram incubadas com a solução reveladora por 3 minutos e 45 segundos. Completado o tempo de permanência nesta solução, as lâminas foram imediatamente imersas em água corrente e lá permaneceram por 5 minutos.

A contracoloração foi feita em hematoxilina de Meyer's, durante 10 minutos à temperatura ambiente, a seguir desprezou-se o excesso do corante e fez-se a diferenciação em hidróxido de amônio por mais 10 minutos. Finalizada a reação, retirou-se o esmalte e procedeu-se a desidratação em álcoois de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante 3 minutos cada e depois 1 banho de xilol/álcool (v/v) por 1 minuto e xilol por 1 minuto. As lâminas foram montadas em laminula e Entelam.

3.6.3) REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO ANTISORO DE CAMUNDONGO ANTI-CEPA PJA E RESGATE ANTIGÊNICO EM FORNO MICROONDAS

O processo de desparafinização dos cortes e bloqueio da peroxidase endógena foram realizados conforme descrito para o item 3.6.1.

O resgate de sítios antigênicos foi feito em forno microondas Sharp (Sharma *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1991) potência máxima (700 watts). As lâminas foram imersas em tampão citrato constituído de 2,1g de ácido cítrico anidro (CAAL), 1 litro de água destilada e NaOH 2M até atingir o pH 6,0 e foram realizados 2 ciclos de 5 e 2 ciclos de 4 minutos cada, com intervalo de 1 minuto entre cada ciclo. As lâminas foram aclimatadas durante 20 minutos à temperatura ambiente, lavadas em água corrente durante 10 minutos, tempo em que os cortes foram circundados com esmalte e foram imersas em PBS como acima citado.

Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro normal da mesma espécie que o antisoro secundário, soro de cabra a 2% durante 20 minutos a 37°C, diluído em PBS.

Após este tempo as lâminas foram incubadas com antisoro primário, durante toda a noite, a 4°C. O antisoro primário foi soro de camundongo anti-cepa PJA diluído em PBS. A diluição do antisoro primário dependeu do título obtido no teste de ELISA descrito anteriormente.

Como controle da reação utilizou-se soro de camundongo não imune na mesma diluição do antisoro primário.

Após incubação com o antisoro primário, as lâminas foram aclimatadas, durante 30 minutos à temperatura ambiente e foram a seguir imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

O antisoro secundário utilizado foi soro de cabra anti-IgG de camundongo biotinilada (Sigma), na diluição de 1:2000 em PBS. As lâminas foram incubadas com o antisoro secundário, durante 30 minutos a 37°C; logo após, estas foram imersas em PBS durante 5 minutos, por 2 vezes.

A reação foi amplificada com o complexo ABC na diluição 1:100. As lâminas foram incubadas nesta solução durante 30 minutos a 37°C. Após este período foram imersas em PBS por 2 vezes como anteriormente citado.

A reação foi revelada com uma solução cromógena, filtrada, que consistiu de 2,5mg de DAB-Sigma (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), 5ml de PBS e 6,0µl de peróxido de hidrogênio 100 vol. (30%) adicionada no momento do uso.

As lâminas cujo fixador utilizado foi formol, foram incubadas por 5 minutos, mas as que foram fixadas com Bouin-Hollande foram incubadas com a solução reveladora por 3 minutos e 45 segundos. Completado o tempo de permanência nesta solução, as lâminas foram imediatamente imersas em água corrente e lá permaneceram por 5 minutos.

A contracoloração foi feita em hematoxilina de Meyer's, durante 10 minutos à temperatura ambiente, a seguir desprezou-se o excesso do corante e fez-se a diferenciação em hidróxido de amônio por mais 10 minutos. Finalizada a reação, retirou-se o esmalte e procedeu-se a desidratação em álcoois de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante 3 minutos cada e depois 1 banho de xilol/álcool (v/v) por 1 minuto e xilol por 1 minuto. As lâminas foram montadas em lamínula e Entelam.

3.7) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E “WESTERN BLOTTING” UTILIZANDO ANTISORO ANTI-Hsp70 PARA DETECÇÃO DE BANDAS RECONHECIDAS EM *T. GONDII*

Antígenos de taquizoítas da cepa RH (antígeno solubilizado em detergente aniônico NP-40) e da cepa ME-49 (liofilizado), foram diluídos em tampão de amostra (v/v), constituído de 0,1M Tris pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20% e fervidos durante 3 minutos a 100°C. Foram logo após submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14% como descrito por Laemmli (1970), paralelamente com a proteína Hsp70 133P-C, como controle positivo. Para realização do “Western blotting” (Towbin *et al.*, 1979), o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose 0,45µm (Sigma Co. St Louis - MO, USA) em cuba de transferência (NOVABLOT - Eletrophoretic Transfer Kit - Multiphor II - Pharmacia-LKB) na presença de tampão de transferência apropriado, durante 2 horas a uma corrente de 0,8mA por cm². Após a transferência, realizou-se a coloração da membrana de nitrocelulose em solução de Ponceau a 0,5% por 2 minutos e descorou-se pela água destilada.

A nitrocelulose, após a transferência, foi cortada em tiras, correspondentes a cada antígeno e foram colocadas em bandejas de acrílico contendo vários compartimentos. Sofreram uma lavagem em água destilada e a seguir bloqueio de sítios inespecíficos de ligação com PBS adicionado de Tween 20 0,05% e leite desnatado Molico 5%, durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Procedeu-se então a uma lavagem em PBS-T-0,05% + leite desnatado 1% (PBS-TM). O antisoro anti-Hsp70 em análise “Western blot” utilizando ¹²⁵I-proteína A como conjugado é 500 (Amorim Filho, 1994). Nesta reação o título que apresentou melhores resultados foi 250. O antisoro foi diluído em PBS-T-0,05% com leite desnatado 1% e a seguir adicionado às membranas de nitrocelulose que foram incubadas durante uma noite a

4°C. Como controle, utilizou-se soro de coelho não imune em uma membrana contendo a proteína de “stress” 133P-C.

Após este período de incubação, foram feitas 6 lavagens durante 5 minutos cada, em PBS-T-0,05% com leite desnatado 1%, em agitação à temperatura ambiente e fez-se nova incubação, agora com anticorpo secundário. Este consistiu de antisoro de carneiro anti-coelho marcado com peroxidase, na diluição de 1:300 em PBS-T-0,05% e leite desnatado 1% (PBS-TM), com incubação por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta.

As membranas foram lavadas em PBS, por 6 vezes de 5 minutos cada e adicionou-se o substrato, 2,5mg de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) em 15ml de PBS e 225µl de H₂O₂ 30%. O bloqueio da reação foi realizado após 10 minutos com água destilada. O resultado da reação foi analisado pela visualização das bandas antigênicas reconhecidas pelo antisoro de coelho e sua comparação com os padrões de peso molecular da Pharmacia, “High Molecular Weight” (Thyroglobulin - 669 kDa, Ferritin - 440 kDa, Catalase - 232 kDa, Lactate Dehydrogenase - 140 kDa, Albumin - 67 kDa) e “Low Molecular Weight” (Phosphorylase b - 94 kDa, Albumin - 67 kDa, Ovalbumin - 43 kDa, Carbonic Anhydrase - 30kDa, Trypsin Inhibitor - 20,1 kDa, α-Lactalbumin - 14,4 kDa).

3.8) MICROSCOPIA DE LUZ

Após o término de todas as reações de imunocitoquímica, as lâminas foram analisadas quanto à presença de taquizoítas e cistos. Quando presentes, os cistos foram contados e comparados quanto ao número em cada condição de depleção de célula T ou neutralização de citocinas. Para determinação do número de cistos cerebrais, estes foram contados em ao menos 9 seções teciduais, por condição de tratamento, sendo estas obtidas a partir de cortes semiseriados.

3.9) ANÁLISE DE IMAGENS

Foi realizada uma análise computadorizada das imagens dos cistos, quanto à fotometria e morfometria, onde foi possível avaliar comparativamente o tamanho dos cistos e intensidade de coloração destes em diversas condições de imunossupressão do animal.

Esta análise computadorizada foi realizada no Laboratório de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, sob a orientação do Dr. João Kazuyuki Kajiwara. Neste sistema que consiste de um microscópio óptico acoplado a um computador; os cortes teciduais foram focalizados ao microscópio em um aumento de 160 vezes, na presença de um filtro de comprimento de onda de 470 - 480nm para leitura da coloração fornecida pelo substrato DAB. As imagens foram então automaticamente capturadas e convertidas em cores da escala cinza pelo programa (Figura 5). O programa utilizado para captura e análise de imagens foi o UTHSCSA *Image Tool*, desenvolvido na Universidade do Centro de Ciências da Saúde do Texas, San Antônio, Texas.

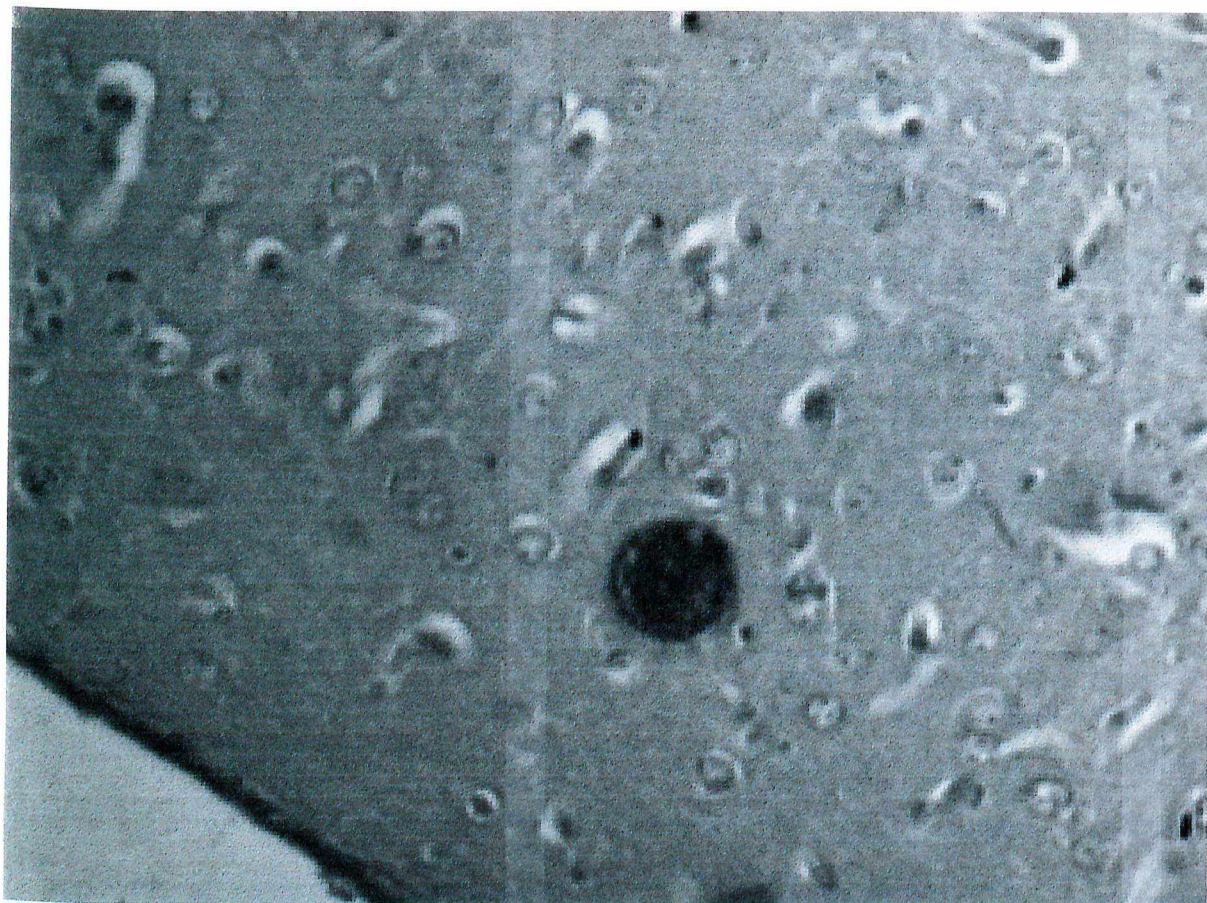


Figura 5 - Imagem capturada pelo programa UTHSCSA *Image Tool* e convertida em cores da escala cinza. Tecido cerebral de camundongo C57BL/6 cronicamente infectado com a cepa ME-49 de *T. gondii*.

As imagens capturadas são formadas por pixels, que são representados por uma escala de cores cinza, que vai de 0 a 255, sendo o zero representante da cor preta e 255 representante da cor branca. Na Figura 5 observa-se uma amostra representativa das amostras capturadas. Estes valores foram convertidos pela escala *ua* 255, em números absolutos. Nas análises fotométricas utilizou-se a moda, obtida dos pixels que formam a imagem. Foi analisada a área do cisto escolhida em comparação com uma área tecidual bem próxima ao cisto. Para comparações entre animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, cujos tecidos foram fixados em formol, com animais que sofreram neutralização de IFN- γ ou TNF- α (tecidos fixados em Bouin-Hollande); todos os resultados à fotometria foram subtraídos dos respectivos resultados de reações desenvolvidas com soro não imune, pois como foram utilizados fixadores diferentes em tais animais, os resultados dos controles das reações foram diferentes. O programa fornece também a área em micrômetros do cisto e a partir desta, o diâmetro foi calculado com o auxílio da fórmula:

$$\text{Área} = \pi \times r^2$$

3.10) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Microsoft Excel. Os resultados das análises das reações com cada antisoro, foram comparados entre as diversas condições de imunossupressão pelo teste de ANOVA: Fator único. Se observada significância, o teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes, foi utilizado. A hipótese nula foi rejeitada quando $p > 0,05$.

Resultados

4) RESULTADOS

4.1) RESULTADOS DO TESTE ELISA PARA DEFINIÇÃO DOS TÍTULOS DOS ANTISOROS PRIMÁRIOS, PRODUZIDOS EM COELHO E CAMUNDONGO

4.1.1) RESULTADOS DO TESTE ELISA PARA DEFINIÇÃO DOS TÍTULOS DOS ANTISOROS PRIMÁRIOS PRODUZIDOS EM COELHO

Nestas reações utilizou-se antisoro secundário de cabra anti-coelho marcado com peroxidase, que apresentava o título de 20000 em testes prévios de ELISA.

Os títulos obtidos pelo teste ELISA para cada antisoro, estão representados na Tabela

1. O título obtido pelo antisoro anti-bradizoíta, foi muito baixo, dificultando o seu uso nas reações de imunocitoquímica.

A partir desta reação ficou definido que o antisoro primário a ser utilizado na padronização das reações de imunocitoquímica, seria o antisoro de coelho anti-cepa RH, devido a seu alto título.

Tabela 1 - Resultados do teste ELISA para a definição dos títulos de anticorpos anti-P30, anti-P22, anti-bradizoíta, anti-oocisto, anti-cepas PLK, PTgB, CEP e RH de *T. gondii*, produzidos em coelho.

Antisoros	Títulos ELISA	Valor de absorbância na diluição limite*
Anti-P30	800	0,471
Anti-P22	400	0,476
Anti-bradizoíta	50	0,405
Anti-oocisto	800	0,383
Anti-cepa PLK	3.200	0,528
Anti-cepa PTgB	800	0,363
Anti-cepa CEP	800	0,411
Anti-cepa RH	6.400	0,437

* "Cut-off" = média do soro não imune mais 2 desvios-padrão (0,358).

4.1.2) RESULTADOS DO TESTE ELISA PARA DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO ANTISORO PRIMÁRIO ANTI-CEPA PJA PRODUZIDO EM CAMUNDONGO

Os títulos obtidos pelo teste ELISA para os antisoros de camundongo anti-cepa PJA, estão representados na Tabela 2.

O antisoro do camundongo nº 4 foi escolhido para ser utilizado nas reações de imunocitoquímica por apresentar o maior título.

Tabela 2- Resultados do teste ELISA para a definição do título de anticorpos anti-cepa PJA de *T. gondii*, produzidos em camundongos.

Camundongo	Títulos ELISA	Valor de absorbância na diluição limite*
1	≥ 8.192	0,283
2	≥ 8.192	0,331
3	≥ 8.192	0,303
4	≥ 8.192	0,378

* “Cut-off”= média do soro não imune mais 2 desvios-padrão (0,196).

4.2) DEFINIÇÃO DOS TÍTULOS DOS ANTISOROS PRIMÁRIOS A SEREM UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE IMUNOCITOQUÍMICA

A reação de imunocitoquímica apresenta um limiar de detecção bem menor que o teste ELISA. Dependendo dos antisoros primários a serem utilizados em tais reações, estes foram concentrados 4 a 16 vezes, a partir do título definido pelo teste ELISA. Reações piloto de imunocitoquímica foram também realizadas, para auxiliar a definição do melhor título e este foi definido quando os cistos cerebrais apresentavam-se bem corados e o tecido cerebral não apresentava coloração. Os títulos que foram utilizados nas reações de imunocitoquímica estão ilustrados na Tabela 3.

O título do antisoro anti-Hsp70 em análise “Western blot” utilizando soro de carneiro anti-imunoglobulina de coelho-peroxidase como conjugado foi 250. Nas reações de imunocitoquímica, o título empregado foi 25.

Tabela 3- Definição dos títulos para os anticorpos anti-P30, anti-P22, anti-bradizoíta, anti-oocisto, anti-cepas PLK, PTgB, CEP, RH, produzidos em coelhos, e anti-cepa PJA, produzido em camundongos, utilizados como antisoros primários nas reações de imunocitoquímica, a partir do teste ELISA.

Antisoros	Títulos ELISA	Títulos para a imunocitoquímica
Anti-P30	800	100
Anti-P22	400	50
Anti-bradizoíta	50	25
Anti-oocisto	800	50
Anti-PLK	3200	250
Anti-PTgB	800	200
Anti-CEP	800	200
Anti-RH	6.400	1.000
Anti-PJA	≥ 8.192	1.000

4.3) RESULTADO DO TESTE ELISA PARA DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO ANTISORO SECUNDÁRIO γ -GLOBULINA DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO BIOTINILADA

Os resultados em absorbância foram satisfatórios, até a diluição $\geq 1:3200$. Houve a necessidade de concentração deste antisoro para uso nas reações de imunocitoquímica, devido a menor sensibilidade desta reação. Reações piloto de imunocitoquímica também auxiliaram a definir o título deste antisoro. O título que forneceu melhores resultados foi 2000.

4.4) PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA

4.4.1) RESULTADO DA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO ANTISORO SECUNDÁRIO DE CABRA ANTI-COELHO MARCADO COM PEROXIDASE

Os cistos teciduais ao nível de microscopia de luz não apresentaram qualquer coloração castanha fornecida pelo DAB. Concentrando-se o antisoro secundário até 1:2000, também não foi observada marcação dos cistos e o tecido apresentou forte reação de fundo ("background"). Este sistema foi abandonado por apresentar resultados desfavoráveis.

4.4.2) RESULTADO DA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO ANTISORO SECUNDÁRIO γ -GLOBULINA DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO BIOTINILADA

Na ausência de resgate antigênico e utilizando-se antisoro secundário na diluição de 1:4000, não houve coloração positiva dos cistos teciduais. Concentrando-se a diluição do

antisoro secundário para 1:2000 os cistos apresentaram-se fracamente positivos, mas o tecido também apresentou-se corado.

4.4.2.1) RESULTADO DA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA COM RESGATE ANTIGÊNICO COM TRIPSINA

Os cistos teciduais apresentaram-se positivamente corados, mas ainda prevalecia uma pequena reação de fundo no tecido (Figura 6).

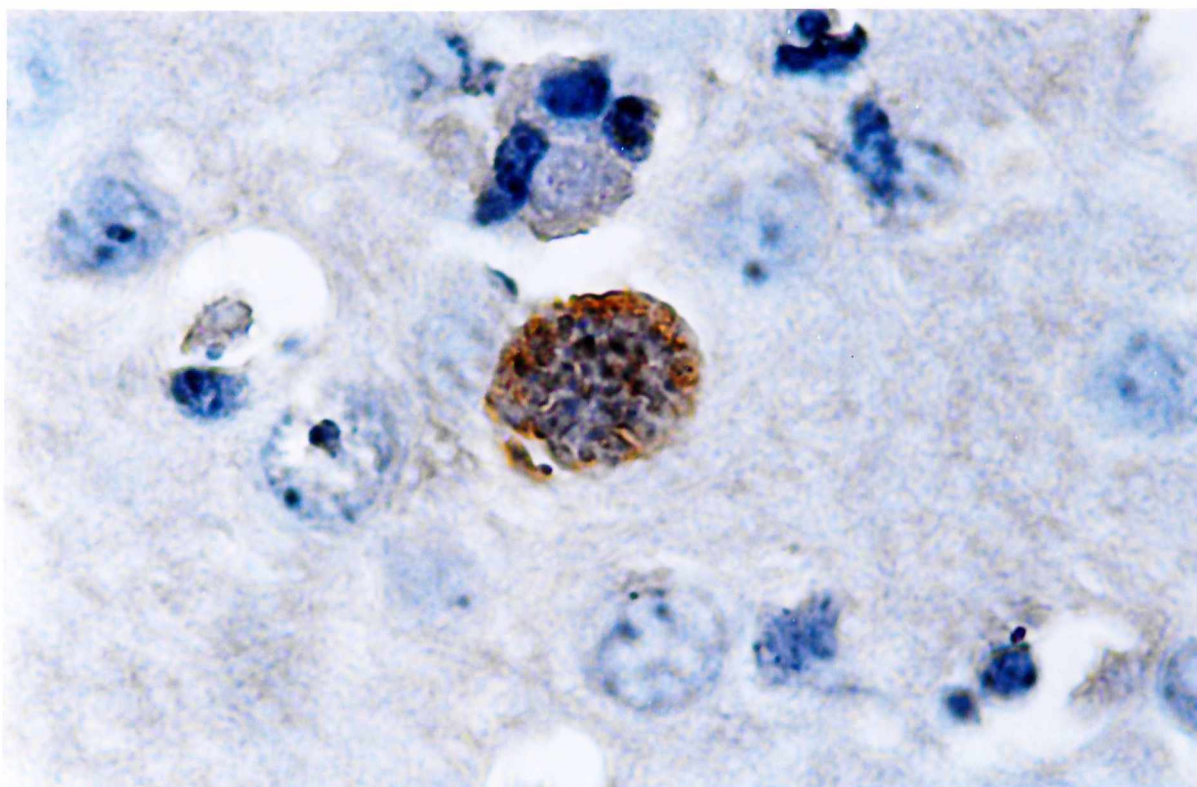


Figura 6 - Expressão de antígeno da cepa RH, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD8⁺. Reação de imunocitoquímica com resgate antigênico por tripsina, 290x.

4.4.2.2) RESULTADO DA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA COM RESGATE ANTIGÊNICO COM FORNO MICROONDAS

Os cistos teciduais apresentaram forte marcação ou coloração castanha, com mínima reação de fundo no tecido, quando presente. Houve a possibilidade de discriminação dos parasitas dentro dos cistos, o que não foi observado com a reação anterior. Esta reação foi adotada no presente estudo.

Em todas as reações em que o antisoro primário utilizado foi produzido em coelho, o antisoro secundário foi γ -globulina de carneiro anti-IgG de coelho biotinilada, na diluição de 1:2000.

Reações de imunocitoquímica utilizando o antisoro primário anti-bradizoíta foram desenvolvidas, sem resultado satisfatório. Este antisoro foi abandonado.

4.4.3) RESULTADO DA REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO ANTISORO DE CAMUNDONGO ANTI-CEPA PJA E RESGATE ANTIGÊNICO COM FORNO MICROONDAS

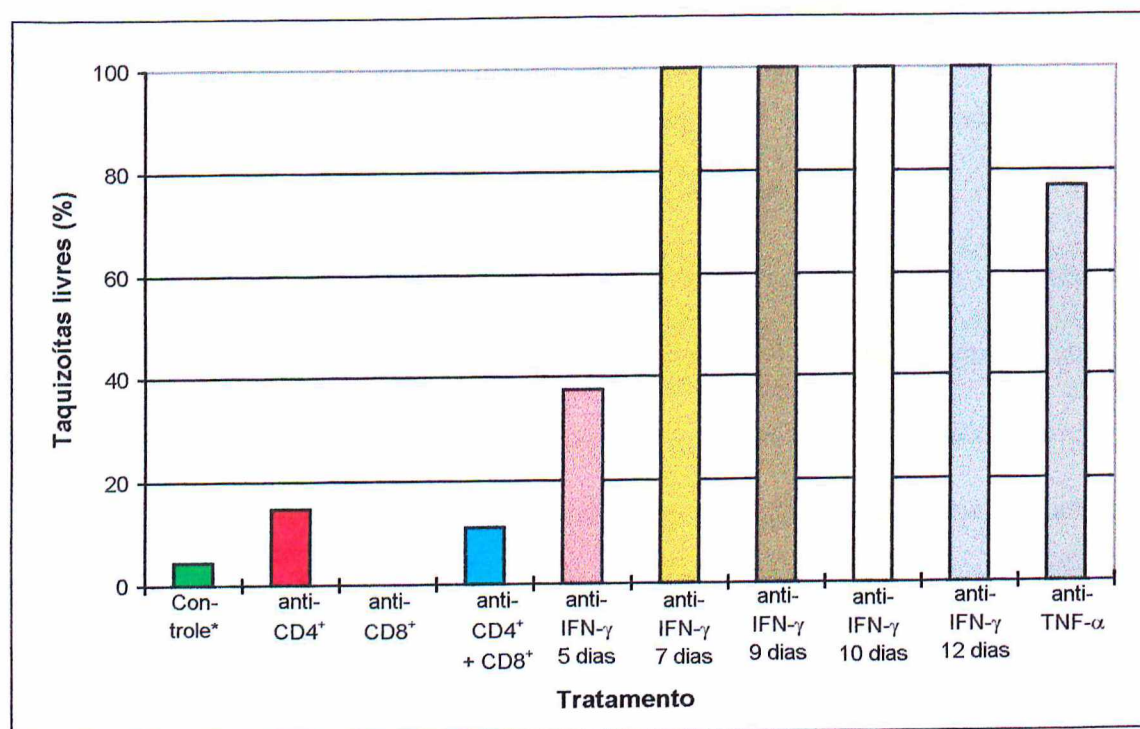
Padronizou-se esta reação conforme a anterior, utilizando-se antisoro secundário de cabra anti-IgG de camundongo biotinilada na diluição de 1:2000, com resultados bastante satisfatórios.

4.5) ANÁLISE A NÍVEL DE MICROSCOPIA DE LUZ

4.5.1) PRESENÇA DE TAQUIZOÍTAS LIVRES NO TECIDO CEREBRAL E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Raros taquizoítas livres foram observados no tecido cerebral, de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ isoladamente ou T CD4⁺ e T CD8⁺ simultaneamente. Resultados semelhantes foram observados em animais tratados com anticorpo monoclonal controle (anti- β -galactosidase). Por outro lado, não se observou a presença de taquizoítas livres em cérebro de animais que sofreram depleção de células T CD8⁺.

Animais neutralizados de IFN- γ a partir do 5º dia, começaram a apresentar taquizoítas livres no tecido cerebral e a partir do 7º dia o número de taquizoítas livres aumentou bastante. Aos 7º, 9º e 10º dias de neutralização, todas as lâminas observadas apresentaram focos de taquizoítas livres. A presença destes foi extremamente elevada no tecido cerebral de animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias, com vários grandes focos, condição em que a mortalidade dos animais foi de 100%. Os animais neutralizados de TNF- α aos 12 dias, também apresentaram taquizoítas livres no tecido cerebral, mas em quantidade menor que os animais neutralizados de IFN- γ aos 7º, 9º, 10º e 12º dias (Figura 7).



* Controle: animais tratados com anticorpo monoclonal anti- β -galactosidase

Figura 7 - Presença de taquizoítas livres no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 e submetidos a diversas condições de imunossupressão.

4.5.2) NÚMERO DE CISTOS POR SEÇÃO DE TECIDO CEREBRAL E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Animais tratados com anticorpo monoclonal anti-CD4⁺, apresentaram maior número de cistos cerebrais que os animais tratados com anticorpo monoclonal anti-CD8⁺ e anticorpo monoclonal controle. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,0018$). Não houve diferença estatística no número de cistos cerebrais entre os animais tratados com anticorpo monoclonal anti-CD4⁺ e os tratados com anticorpo monoclonal anti-CD4⁺ e anti-CD8⁺ ($p = 0,2500$). Os animais tratados com anticorpo monoclonal anti-CD8⁺ apresentaram maior número de cistos que os animais do grupo controle ($p = 0,0075$).

Os animais neutralizados de IFN- γ apresentaram maior número de cistos que os animais do dia zero de neutralização e o número aumentou à medida em que se aumentou o tempo de neutralização desta citocina, culminando com um número extremamente elevado ao 12º dia de neutralização. Observou-se diferença estatística entre animais que sofreram neutralização de IFN- γ durante 12 dias em relação às outras condições de neutralização de IFN- γ ($p \leq 0,0290$). Os animais neutralizados de TNF- α por 12 dias também apresentaram um número bastante elevado de cistos no cérebro, mas o número de cistos nos animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias foi estatisticamente maior ($p < 0,0001$). Camundongos neutralizados de IFN- γ a partir do 7º dia ou neutralizados de TNF- α apresentaram o número de cistos cerebrais maior que os camundongos que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ($p \leq 0,0349$) (Tabela 4 e Figura 8).

Tabela 4- Número de cistos por seção de tecido cerebral de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

GRUPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Anti- β -galactosidase (Controle)	3,5	2,1
Anti-CD4 ⁺	11,2 ^a	9,2
Anti-CD8 ⁺	5,4 ^b	2,8
Anti-CD4 ⁺ + CD8 ⁺	9,6	4,5
Anti- β -galactosidase (5 dias - controle)	4,7	1,7
Anti-IFN- γ 0 dia	6,8	3,8
Anti-IFN- γ 1 dia	10,1	1,3
Anti-IFN- γ 2 dias	8,1	4,9
Anti-IFN- γ 3 dias	8,6	4,4
Anti-IFN- γ 5 dias	11,8	5,8
Anti-IFN- γ 7 dias	30,0 ^d	20,5
Anti-IFN- γ 9 dias	49,5 ^d	0,7
Anti-IFN- γ 10 dias	21,6 ^d	7,4
Anti-IFN- γ 12 dias	128,5 ^{c,d}	49,4
Anti-TNF- α	31,6 ^{d,e}	28,3

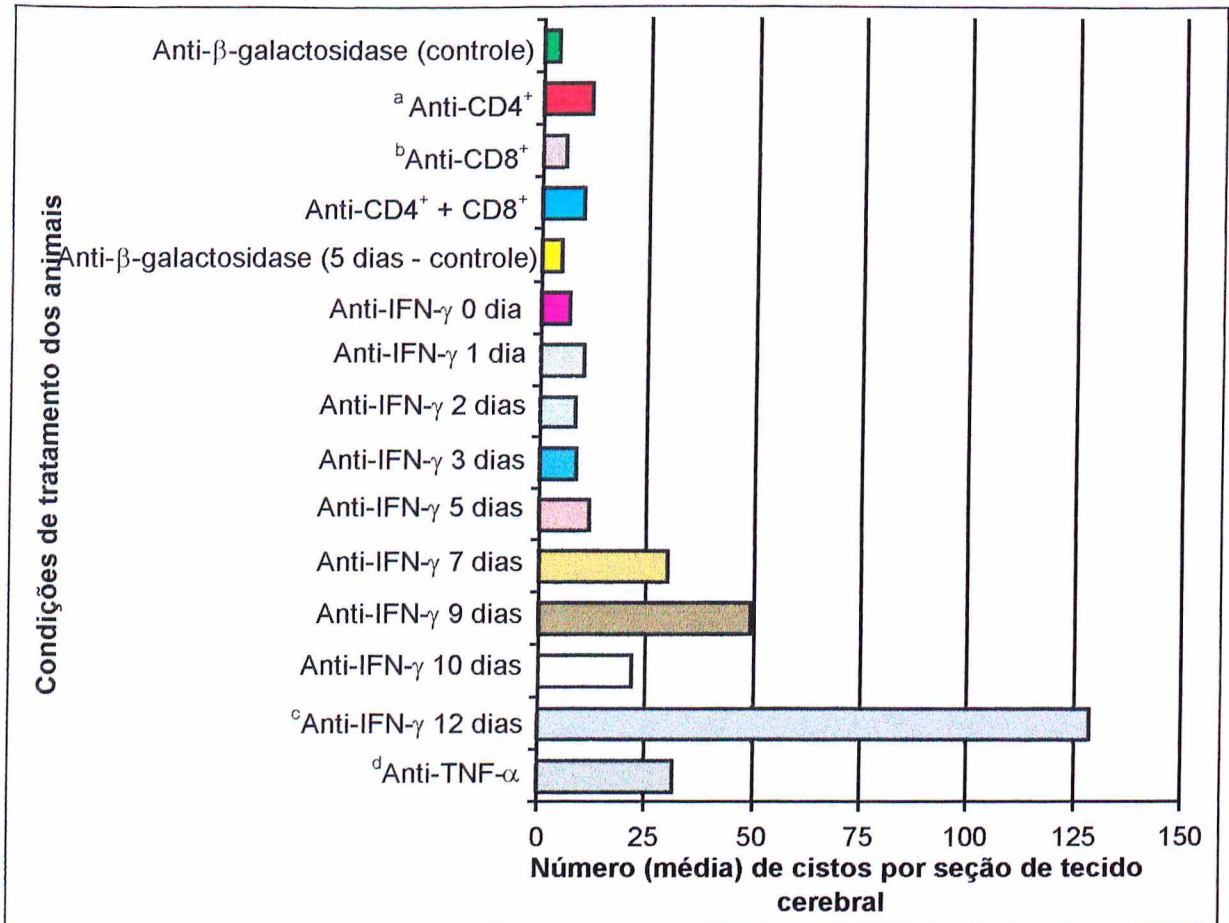
^a Diferença significativa em relação aos animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal anti- β -galactosidase ($p \leq 0,018$).

^b Diferença significativa em relação aos animais tratados com anticorpo monoclonal anti- β -galactosidase ($p = 0,0075$).

^c Diferença significativa em relação à todas as outras condições de imunossupressão do animal ($p \leq 0,0290$).

^d Diferença significativa em relação aos animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ($p \leq 0,0349$).

^e Diferença significativa em relação aos animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias ($p < 0,0001$).



^a Diferença significativa em relação aos animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal anti-β-galactosidase ($p \leq 0,018$).

^b Diferença significativa em relação aos animais tratados com anticorpo monoclonal anti-β-galactosidase ($p = 0,0075$).

^c Diferença significativa em relação à todas as outras condições de imunossupressão do animal ($p \leq 0,0290$).

^d Diferença significativa em relação aos animais neutralizados de IFN-γ por 12 dias ($p < 0,0001$).

Figura 8- Número de cistos por seção de tecido cerebral de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

4.6) ANÁLISE DE IMAGENS - MORFOMETRIA E FOTOMETRIA

4.6.1) ÁREA DE CISTOS POR SEÇÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII* E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ e animais tratados com anticorpo monoclonal controle não apresentaram diferença estatística na área dos cistos examinados ($p \geq 0,0603$). No entanto, animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ apresentaram cistos cerebrais estatisticamente menores que cistos de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ($p = 0,0453$), esta diferença não foi observada entre animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ e animais tratados com anticorpo monoclonal controle ($p \geq 0,2042$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Área de cistos por seção de tecido cerebral de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

GRUPO	MÉDIA (μm^2) $\pm$ DESVIO PADRÃO	LIMITE DE VARIAÇÃO
Anti- β -galactosidase (Controle)	1767,6 $\pm$ 1022,7 ^a	316,5 - 3502,7
Anti-CD4 ⁺	2554,2 $\pm$ 1479,5 ^a	703,8 - 5718,5
Anti-CD8 ⁺	2066,1 $\pm$ 869,4 ^a	558,1 - 4127,5
Anti-CD4 ⁺ + CD8 ⁺	1750,3 $\pm$ 1086,2 ^{a,b}	408,2 - 4119,1
Anti- β -galactosidase (5 dias - Controle)	2121,9 $\pm$ 1825,3	226,8 - 5075,6
Anti-IFN- γ 0 dia	1368,1 $\pm$ 1001,7	591,4 - 2832,2
Anti-IFN- γ 1 dia	2105,3 $\pm$ 2082,8	510,4 - 6086,9
Anti-IFN- γ 2 dias	1966,3 $\pm$ 1240,3	690,0 - 4640,8
Anti-IFN- γ 3 dias	1629,1 $\pm$ 801,7	391,5 - 2886,3
Anti-IFN- γ 5 dias	2013,8 $\pm$ 1537,5	108,7 - 5311,9
Anti-IFN- γ 7 dias	885,2 $\pm$ 959,0	108,3 - 3136,2
Anti-IFN- γ 9 dias	648,7 $\pm$ 720,0	104,0 - 2103,0
Anti-IFN- γ 10 dias	863,4 $\pm$ 575,0	137,1 - 1517,0
Anti-IFN- γ 12 dias	663,6 $\pm$ 924,1 ^c	104,1 - 5343,6
Anti-TNF- α	550,7 $\pm$ 734,4 ^d	129,1 - 3127,9

^a Diferença significativa em relação aos animais neutralizados de IFN- γ por 7 dias ou mais ou neutralizados de TNF- α ($p < 0,0075$).

^b Diferença significativa em relação aos animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ($p = 0,0402$).

^c Diferença significativa em relação aos animais neutralizados de IFN- γ do dia 1 ao dia 5 ($p \leq 0,0009$).

^d Diferença significativa em relação aos animais neutralizados de IFN- γ do dia 0 ao dia 5 ($p \leq 0,0225$).

Animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias, não apresentaram diferença estatística na área dos cistos, quando comparados com animais neutralizados no dia zero ($p \geq 0,0776$), entretanto, animais neutralizados de IFN- γ do dia 1 ao dia 5 apresentaram a área dos cistos estatisticamente maior que a área dos cistos de animais neutralizados por 12 dias ($p \leq 0,0009$). Animais neutralizados de TNF- α apresentaram a área dos cistos estatisticamente menor que a área dos cistos de animais que sofreram neutralização de IFN- γ por até 5 dias ($p \leq 0,0225$). Quando os animais foram neutralizados de IFN- γ durante 7 dias ou mais ou foram neutralizados de TNF- α , os cistos apresentaram uma área estatisticamente menor que a área dos cistos dos animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ($p \leq 0,0075$). Não houve diferença estatística na área dos cistos, entre os animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α durante os 12 dias de observação ($p = 0,2710$) (Tabela 5).

4.6.2) DIÂMETRO DE CISTOS POR SEÇÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII* E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

O tamanho dos cistos fornecido pelo diâmetro dos mesmos, variou de 11,5 a 88 μm . Animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ e animais tratados com anticorpo monoclonal controle não apresentaram diferença estatística no diâmetro dos cistos examinados ($p \geq 0,0573$). No entanto animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ apresentaram cistos cerebrais estatisticamente menores que cistos de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ($p = 0,0402$), esta diferença não foi observada entre animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ e animais tratados com anticorpo monoclonal controle ($p \geq 0,1798$) como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6- Diâmetro de cistos por seção de tecido cerebral de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

GRUPO	MÉDIA (μm) $\pm$ DESVIO PADRÃO	LIMITE DE VARIAÇÃO
Anti- β -galactosidase (Controle)	45,4 $\pm$ 14,4 ^a	20,1 - 66,8
Anti-CD4 ⁺	54,8 $\pm$ 16,2 ^a	29,9 - 85,3
Anti-CD8 ⁺	50,1 $\pm$ 11,1 ^a	26,7 - 72,5
Anti-CD4 ⁺ + CD8 ⁺	44,8 $\pm$ 15,3 ^{a,b}	22,8 - 72,4
Anti- β -galactosidase (5 dias - Controle)	47,7 $\pm$ 23,1	17,0 - 80,4
Anti-IFN- γ 0 dia	39,8 $\pm$ 14,2	27,4 - 60,1
Anti-IFN- γ 1 dia	46,7 $\pm$ 23,5	25,5 - 88,0
Anti-IFN- γ 2 dias	47,8 $\pm$ 15,4	29,6 - 76,9
Anti-IFN- γ 3 dias	43,6 $\pm$ 12,0	22,3 - 60,6
Anti-IFN- γ 5 dias	46,8 $\pm$ 19,7	11,8 - 82,2
Anti-IFN- γ 7 dias	29,1 $\pm$ 17,1	11,7 - 63,2
Anti-IFN- γ 9 dias	25,6 $\pm$ 14,2	11,5 - 51,8
Anti-IFN- γ 10 dias	31,1 $\pm$ 12,5	13,2 - 44,0
Anti-IFN- γ 12 dias	25,6 $\pm$ 14,0 ^c	11,5 - 82,5
Anti-TNF- α	23,3 $\pm$ 12,7 ^d	12,8 - 63,1

^a Diferença significativa em relação aos animais neutralizados de IFN- γ por 7 dias ou mais ou neutralizados de TNF- α ($p \leq 0,0255$).

^b Diferença significativa em relação aos animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ($p = 0,0402$).

^c Diferença significativa em relação aos animais neutralizados de IFN- γ do dia zero ao dia 5 ($p \leq 0,0289$).

^d Diferença significativa em relação aos animais neutralizados de IFN- γ do dia zero ao dia 5 ($p \leq 0,0088$).

Animais neutralizados de IFN- γ até o 10º dia, não apresentaram diferença estatística no diâmetro dos cistos, quando comparados com animais neutralizados no dia zero ($p \geq 0,0711$), entretanto, animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias apresentaram cistos menores que os cistos de animais neutralizados de IFN- γ do dia zero ao dia 5 ($p \leq 0,0289$). Quando os animais foram neutralizados de IFN- γ durante 7 dias ou mais, ou foram neutralizados de TNF- α , os cistos apresentaram um diâmetro estatisticamente menor que o diâmetro dos cistos dos animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ($p \leq 0,0255$). Não houve diferença estatística no diâmetro dos cistos, entre os animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α durante 12 dias ($p = 0,2226$).

4.6.3) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANTÍGENO DE TAQUIZOÍTA P30 NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL ANTI-P30 E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Ao microscópio de luz, foram observados alguns parasitas com coloração castanha dentro dos cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ (Figuras 9, 10 e 11). Em animais que sofreram depleção de células T CD4⁺, alguns poucos cistos não foram corados. A presença de antígeno de taquizoíta, P30, foi também observada em alguns parasitas nos cistos de animais tratados com anticorpo monoclonal controle (Figura 12), apesar de alguns cistos não se apresentarem corados. Entretanto, de acordo com a análise fotométrica, não houve marcação significativa para antígeno P30 em cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal controle (anti- β -galactosidase). Não houve diferença estatística entre a reação desenvolvida com

antisoro de coelho anti-P30, nos cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal controle e a reação desenvolvida com o antisoro de coelho não imune ($p = 0,1764$ e $p = 0,3866$, respectivamente), como pode ser observado na Figura 13. Pela análise fotométrica foi possível observar que houve diferença estatística na intensidade de marcação dos cistos de animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ somente ($p = 0,0081$) ou T CD4⁺ e T CD8⁺ ($p = 0,0074$) na reação desenvolvida com antisoro anti-P30, quando comparadas com aquelas desenvolvidas com soro de coelho não imune (Figura 13), mostrando a presença significativa de antígeno P30 nos cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ ou T CD4⁺ e T CD8⁺.

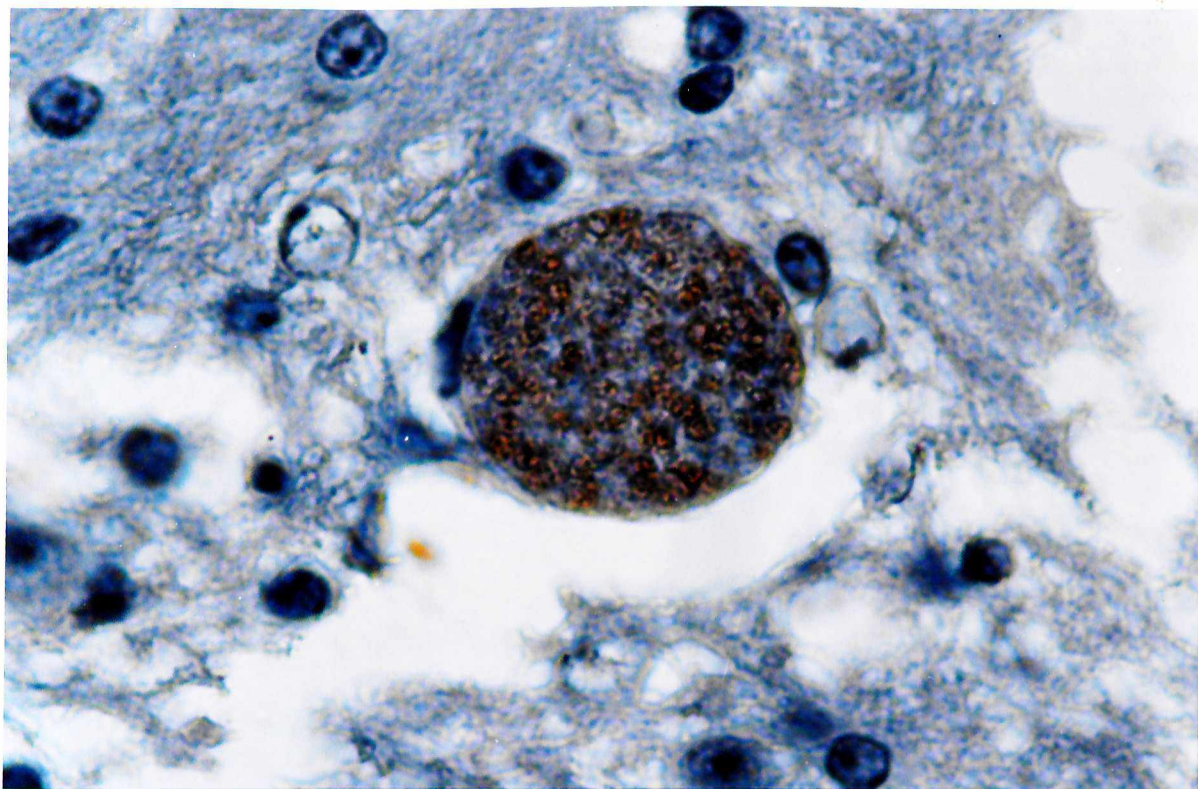


Figura 9 - Expressão do antígeno de tachizoíta P30, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺, 290x.

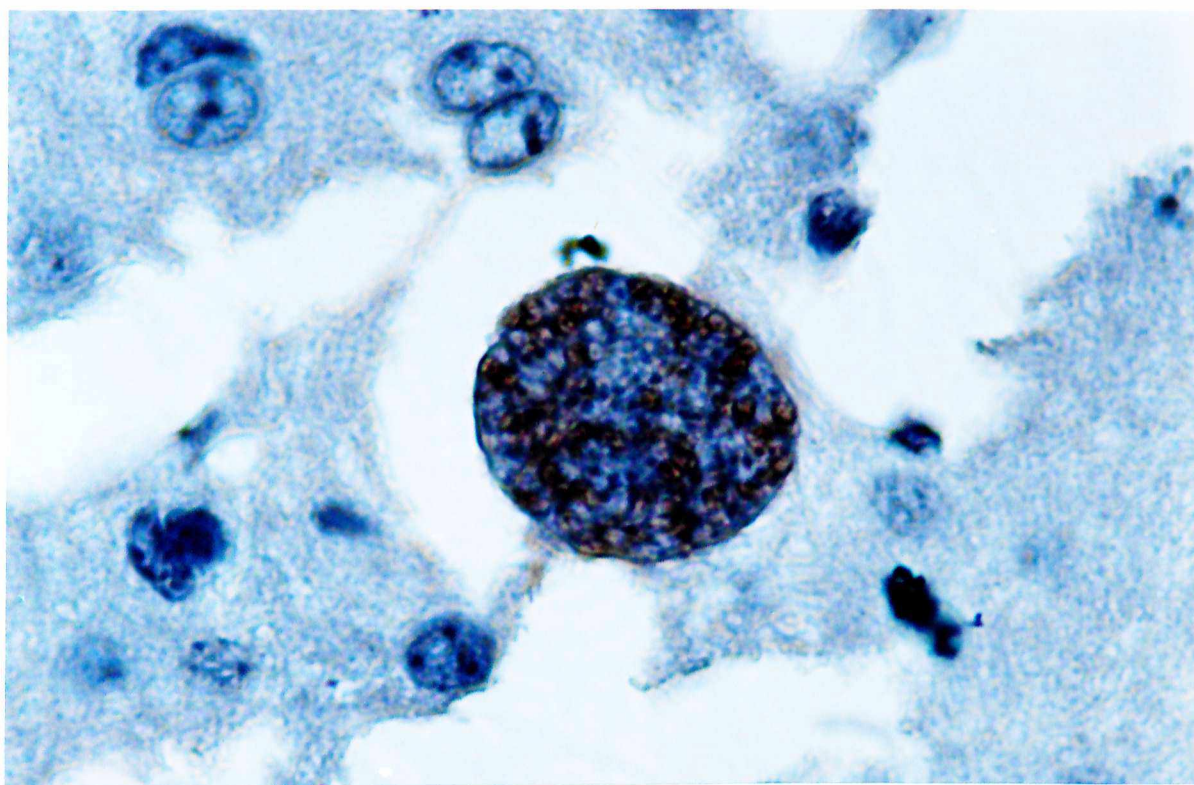


Figura 10 - Expressão do antígeno de tachizoíta P30, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD8⁺, 290x.

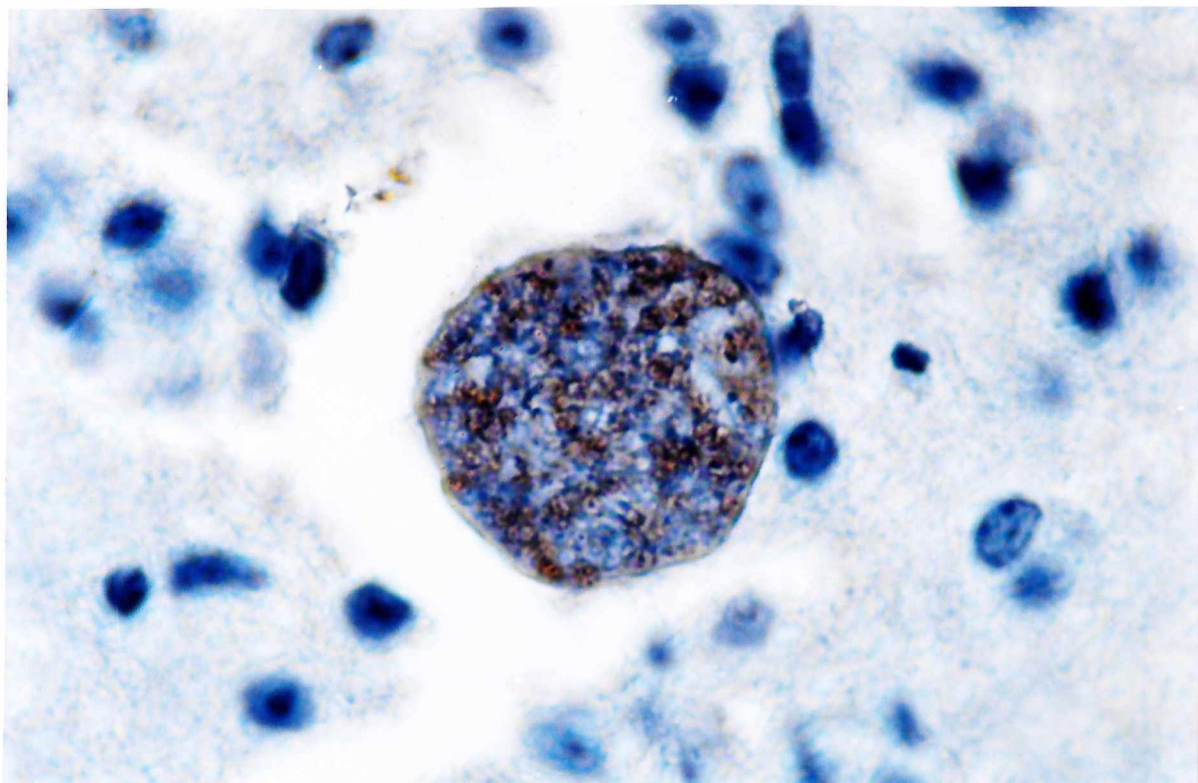


Figura 11 - Expressão do antígeno de taquizoíta P30, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, 290x.

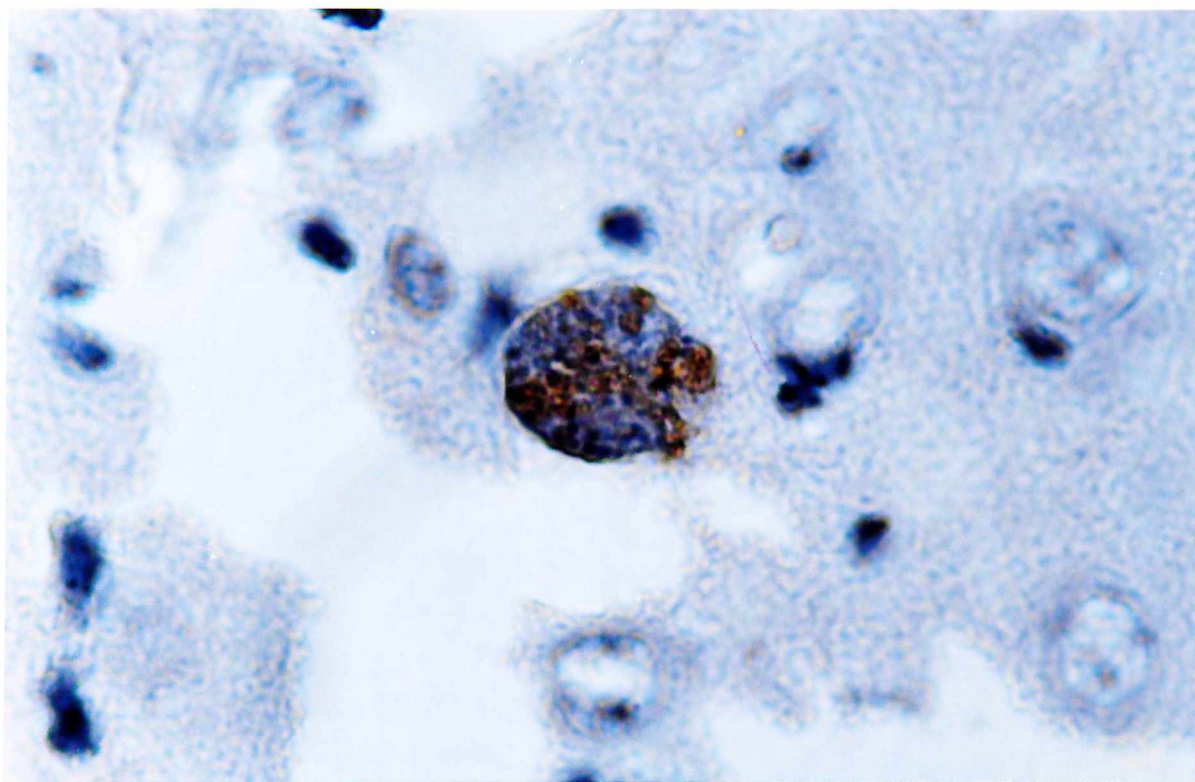
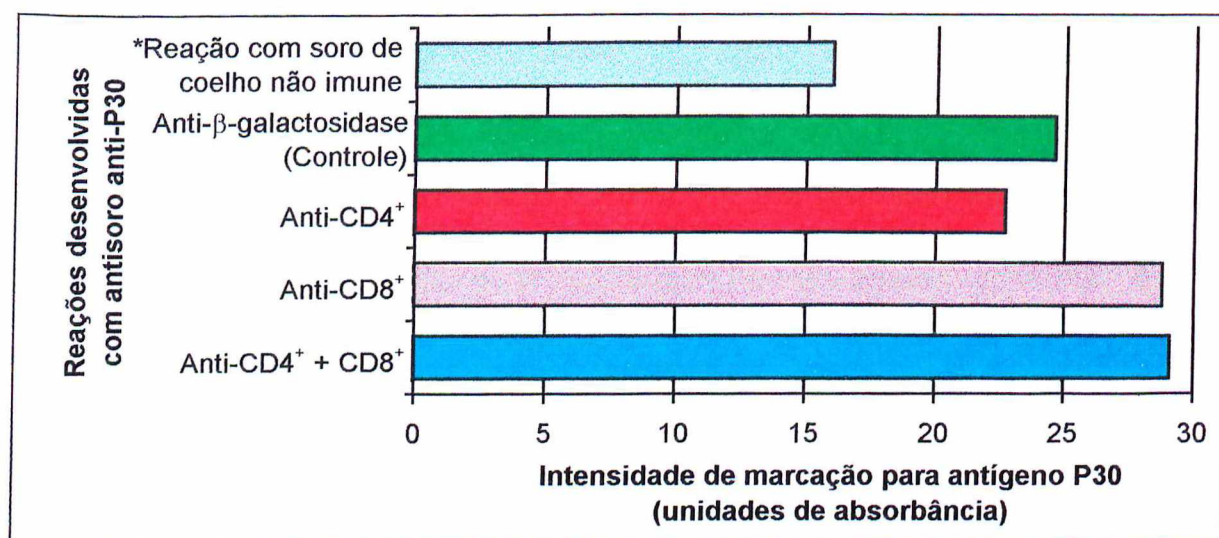


Figura 12 - Expressão do antígeno de taquizoíta P30, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que foram tratados com anticorpo monoclonal controle anti- β -galactosidase, 290x.



* Controle da reação

Figura 13- Detecção do antígeno P30, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

Ao nível de microscopia de luz observou-se que, quando os animais foram neutralizados de IFN- γ ou TNF- α , a expressão do antígeno nos cistos cerebrais tornou-se mais homogênea na maioria dos cistos (Figuras 14 e 15), embora este padrão não tenha sido observado em todos os cistos. Os taquizoítas livres também apresentaram coloração castanha (Figura 16). Esta maior expressão do antígeno P30 foi confirmada pela análise fotométrica, como é demonstrado na Figura 17. Pela análise fotométrica, os cistos dos animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ não foram estatisticamente diferentes quanto a marcação dos parasitas para o antígeno P30, quando comparados com os animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias ($p = 0,0511$), como pode ser observado na Figura 18. Entretanto, animais neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 9 dias, ou neutralizados de TNF- α , apresentaram uma marcação para antígeno P30 maior que animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ ($p \leq 0,0459$). Aos 7º e 9º dias de neutralização da citocina IFN- γ , os parasitas apresentaram a maior intensidade de marcação para o antígeno ($p \leq 0,0028$), quando comparados com animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias. Não houve diferença estatística, entre a intensidade de marcação de animais neutralizados de IFN- γ por 7, 9 ou 12 dias e neutralizados de TNF- α ($p \geq 0,0786$). A expressão de P30 não aumentou linearmente com o grau de imunossupressão do animal, provocado pelo maior tempo de neutralização de IFN- γ (Figura 18).

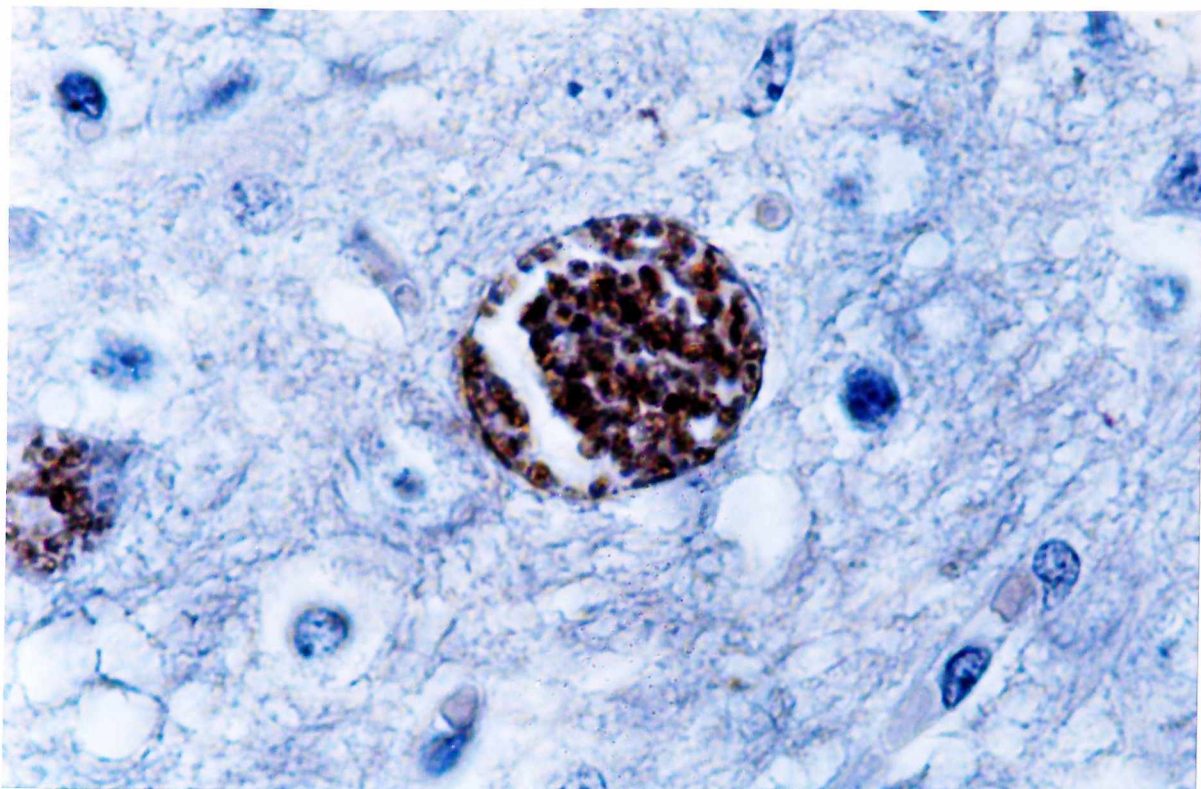


Figura 14 - Expressão do antígeno de taquizoíta P30, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de IFN- γ durante 3 dias, 290x.

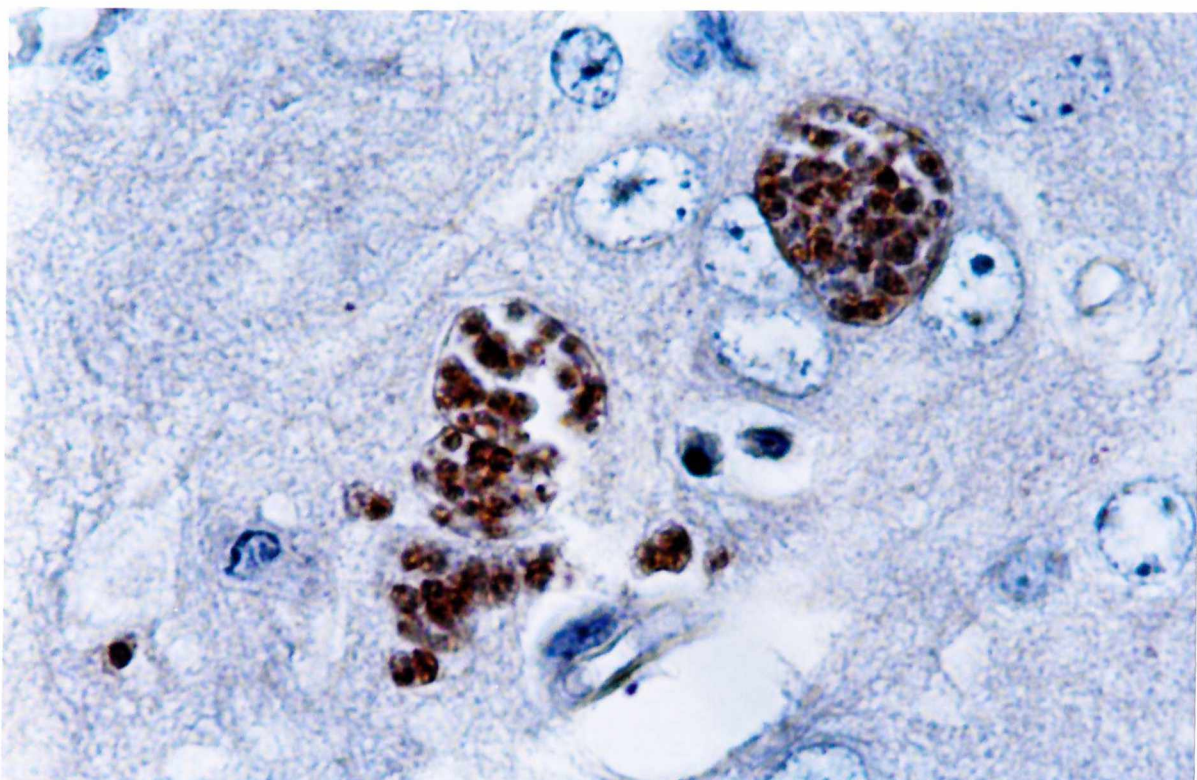


Figura 15 - Expressão do antígeno de taquizoíta P30, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de TNF- α durante 12 dias, 290x.

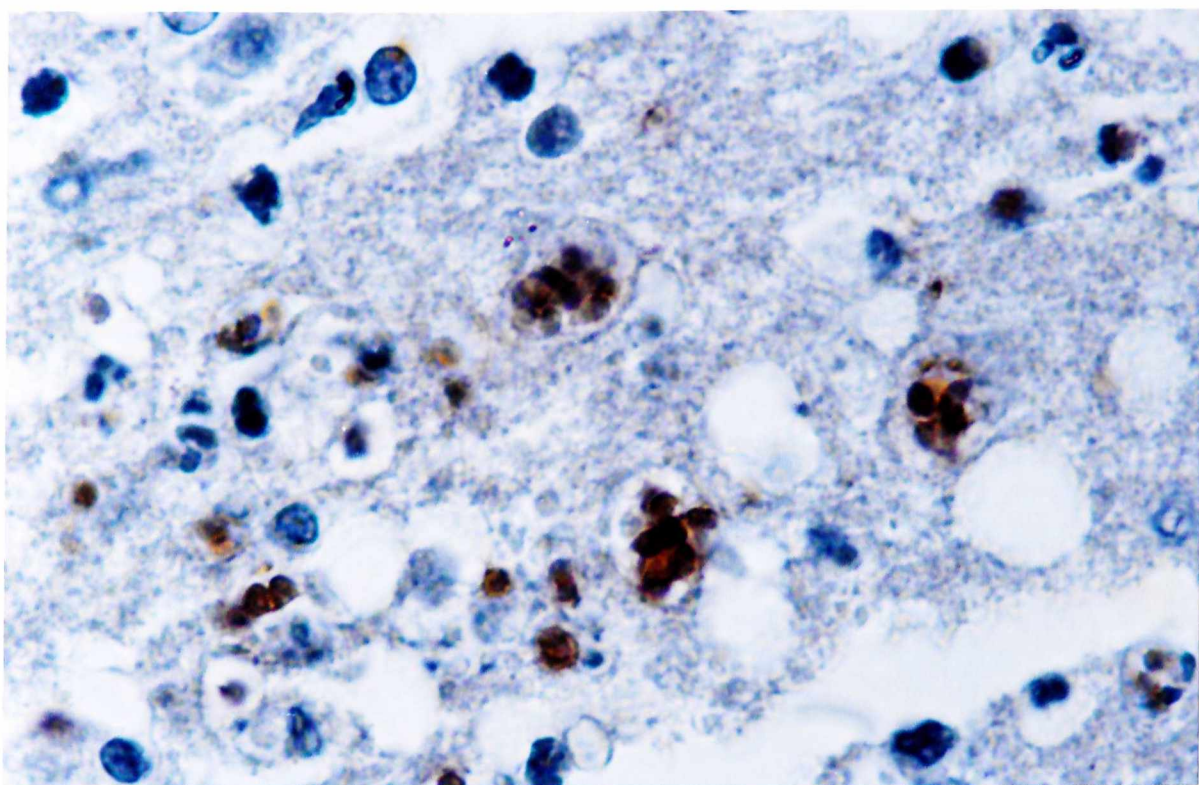
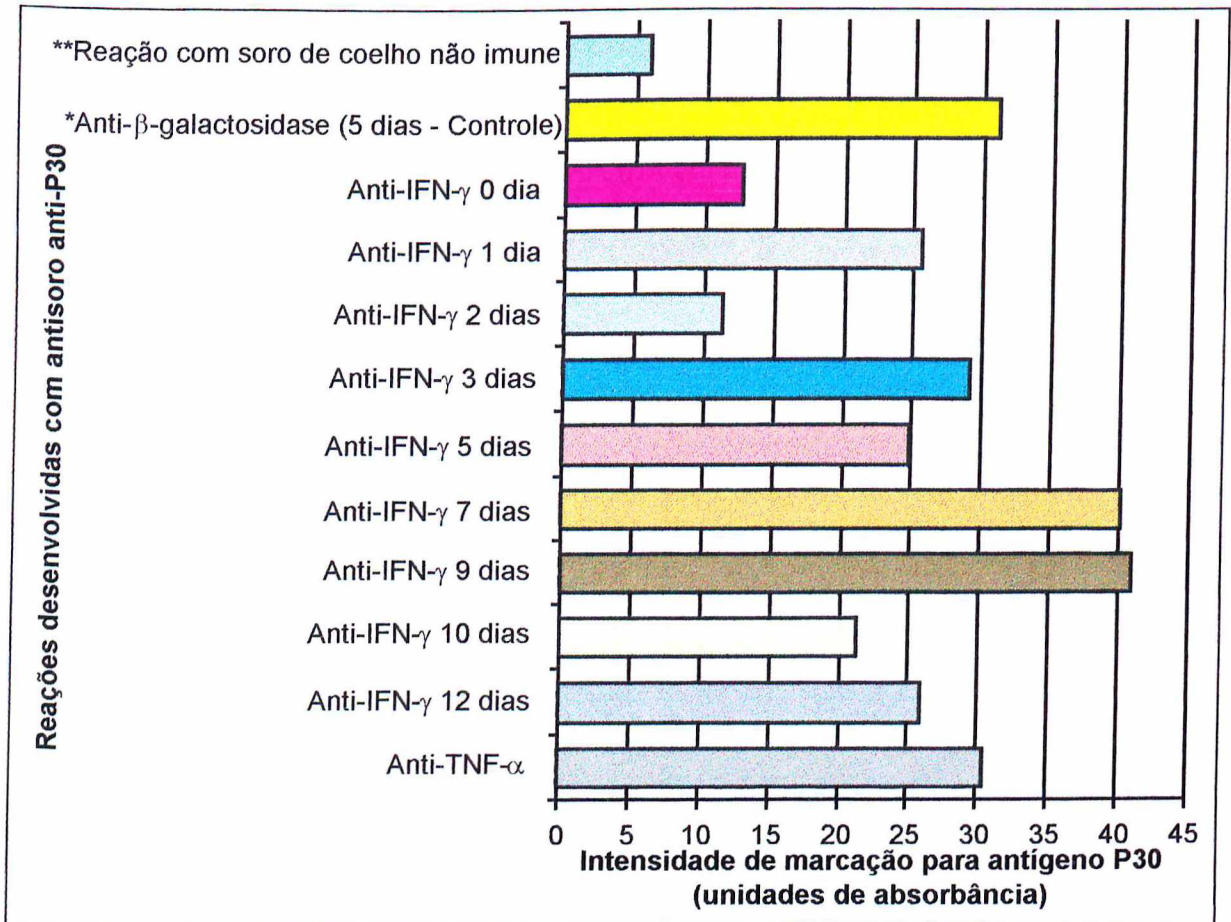


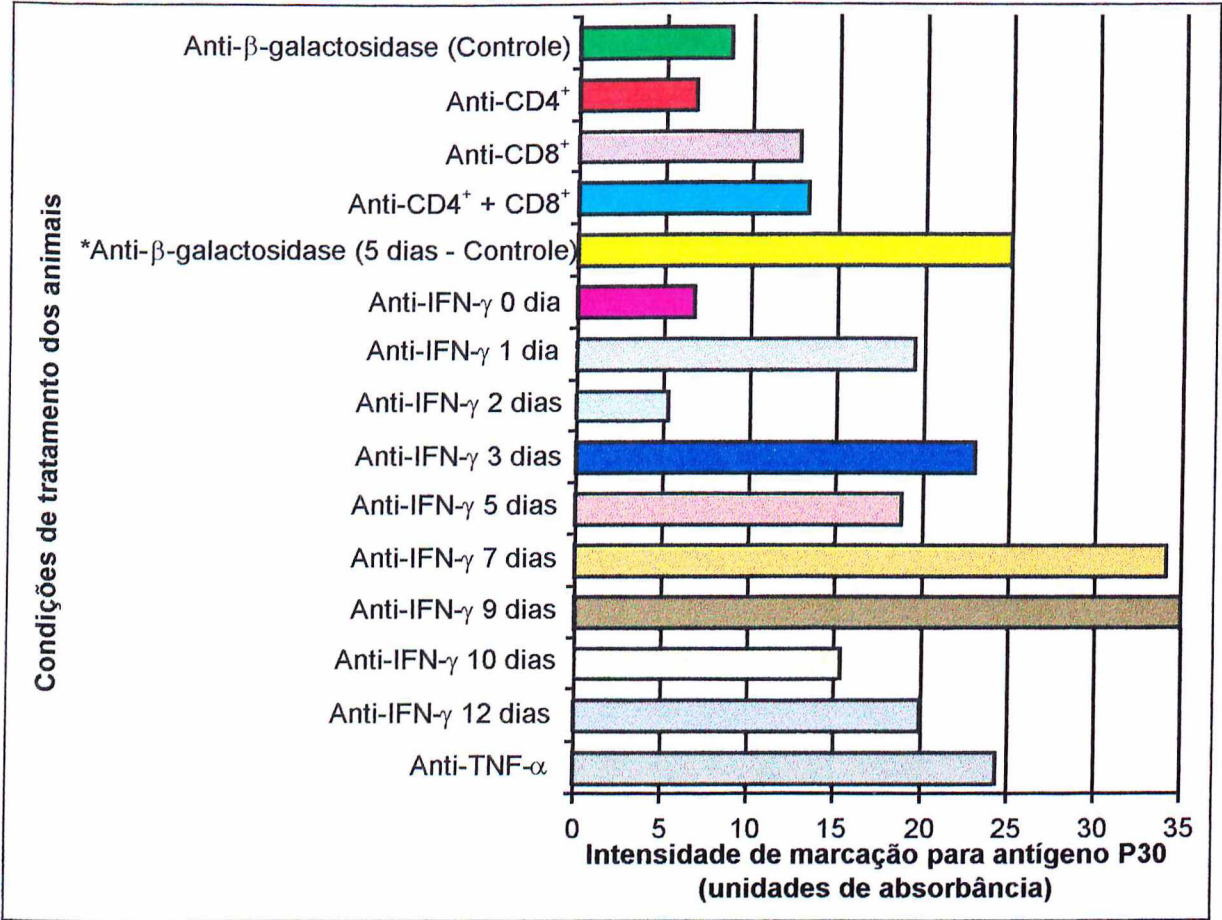
Figura 16 - Expressão do antígeno de tachizoíta P30, em tachizoítas livres e cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de IFN- γ durante 7 dias, 290x.



** Controle da reação

* Valores representativos de 2 animais apenas

Figura 17- Detecção do antígeno P30, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por neutralização de IFN-γ ou TNF-α.



* Valores representativos de 2 animais apenas

Figura 18- Detecção do antígeno P30, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN-γ ou TNF-α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.6.4) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANTÍGENO P22 NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL ANTI-P22 E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Ao nível de microscopia de luz, alguns parasitas dentro dos cistos cerebrais apresentaram coloração castanha quando se utilizou antisoro anti-P22. Como pode ser observado nas Figuras 19, 20 e 21, animais que sofreram depleção de células T $CD4^+$ e/ou T $CD8^+$ apresentaram coloração nos cistos cerebrais para antígeno de taquizoíta P22. Animais tratados com anticorpo monoclonal controle também apresentaram o mesmo padrão de coloração (Figura 22).

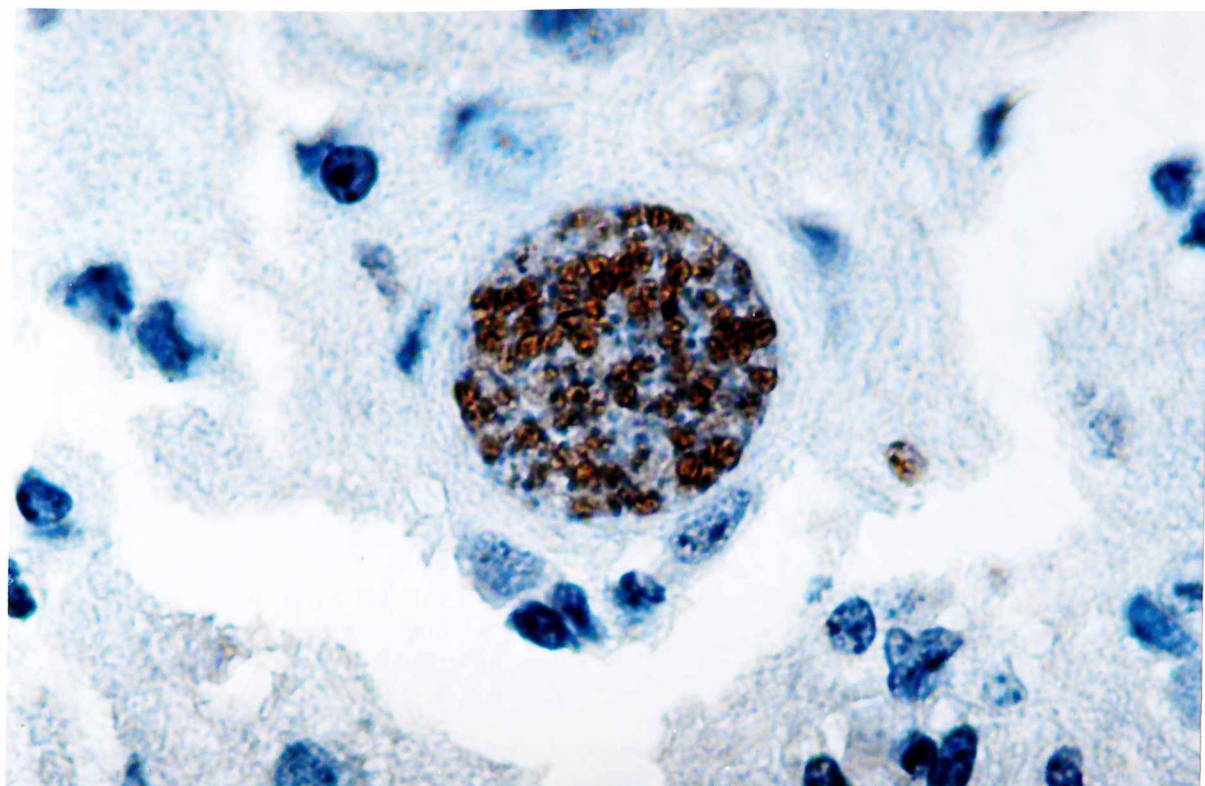


Figura 19 - Expressão do antígeno de taquizoíta P22, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺, 290x.

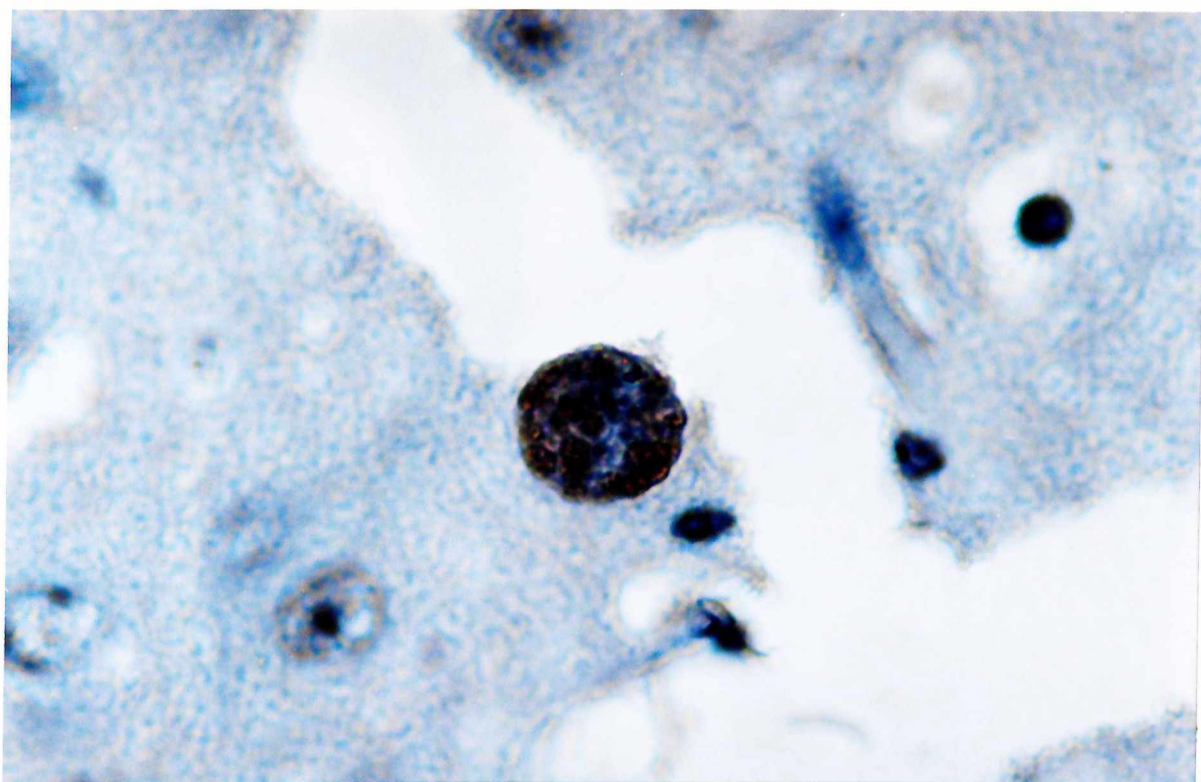


Figura 20 - Expressão do antígeno de taquizoíta P22, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD8⁺, 290x.

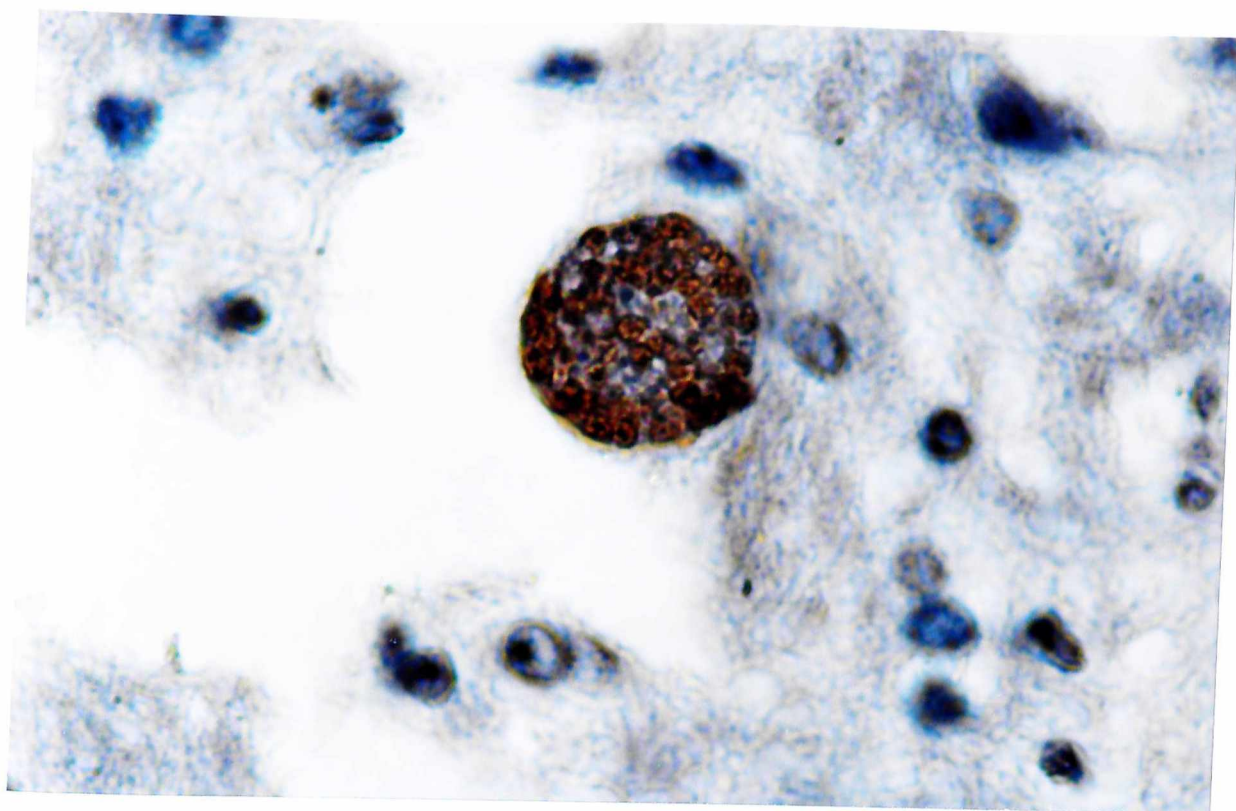


Figura 21 - Expressão do antígeno de taquizoíta P22, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, 290x.

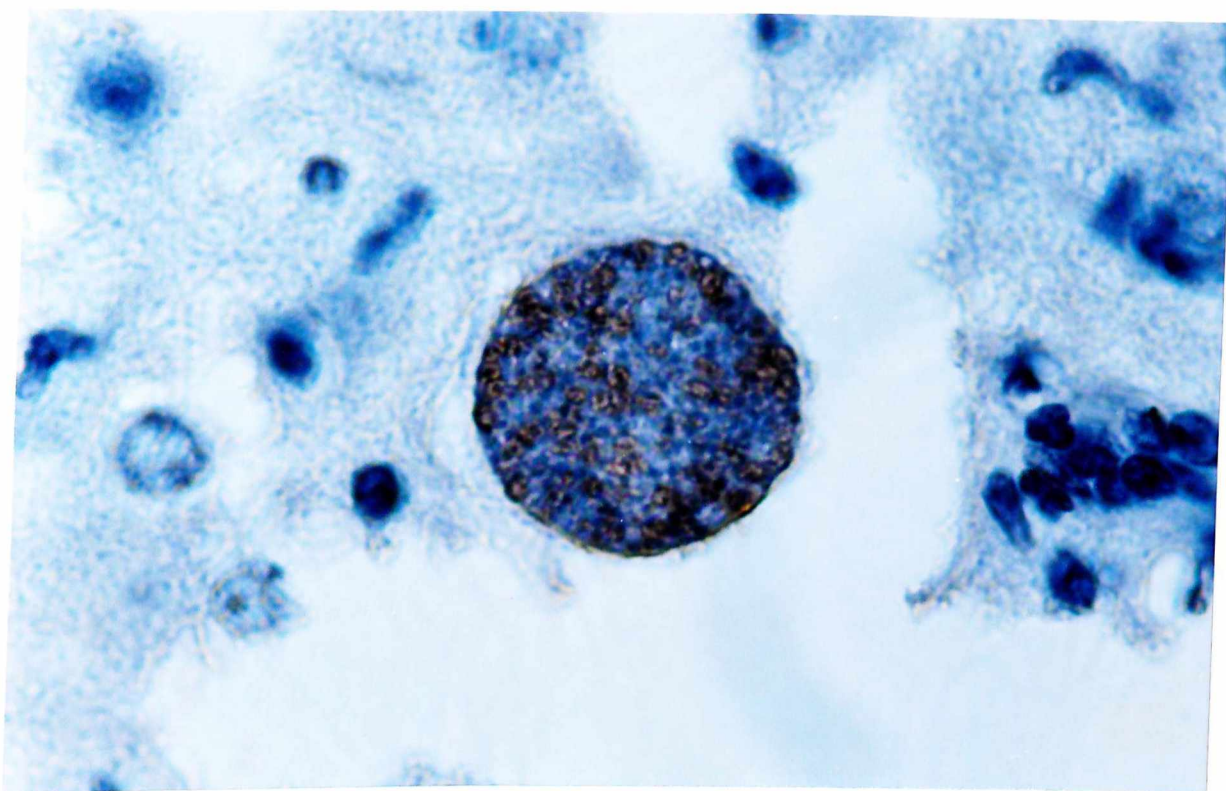
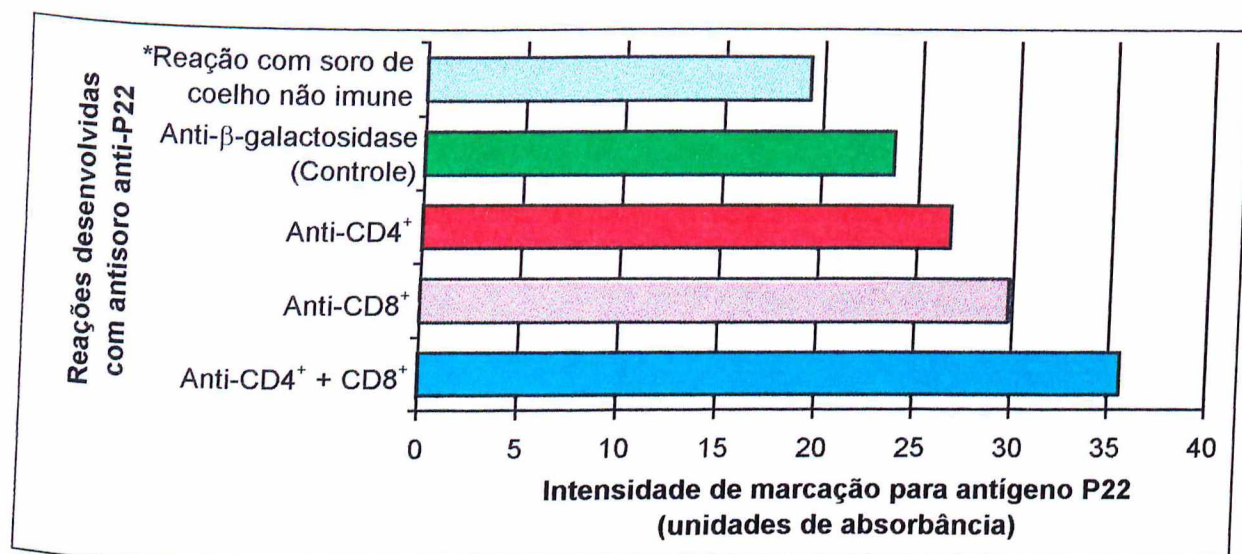


Figura 22 - Expressão do antígeno de taquizoíta P22, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que foram tratados com anticorpo monoclonal controle, anti- β -galactosidase, 290x.

Ao nível de análise fotométrica, não houve diferença estatística entre as reações desenvolvidas com antisoro anti-P22 nos cistos cerebrais de animais tratados com anticorpo monoclonal controle e as reações desenvolvidas com soro de coelho não imune com $p = 0,1277$ (Figura 23). Entretanto, por estas análises, foram observadas diferenças na intensidade de marcação dos cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T $CD4^+$ e/ou T $CD8^+$ nas reações desenvolvidas com antisoro anti-P22, com cistos em reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0159$) (Figura 23), confirmando o padrão da marcação. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as reações desenvolvidas com antisoro anti-P22 em animais que sofreram depleção de células T $CD4^+$ ($p = 0,1519$) ou T $CD8^+$ ($p = 0,0715$) com as reações desenvolvidas em animais tratados com antisoro monoclonal controle, embora em animais que sofreram depleção de T $CD4^+$ e T $CD8^+$ esta diferença foi significativa ($p = 0,0067$).



* Controle da reação.

Figura 23- Detecção do antígeno P22, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

Quando os animais foram neutralizados de IFN- γ ou TNF- α , observou-se ao microscópio de luz que a grande maioria dos parasitas dentro dos cistos apresentaram-se corados, como também os taquizoítas livres. (Figuras 24 e 25)

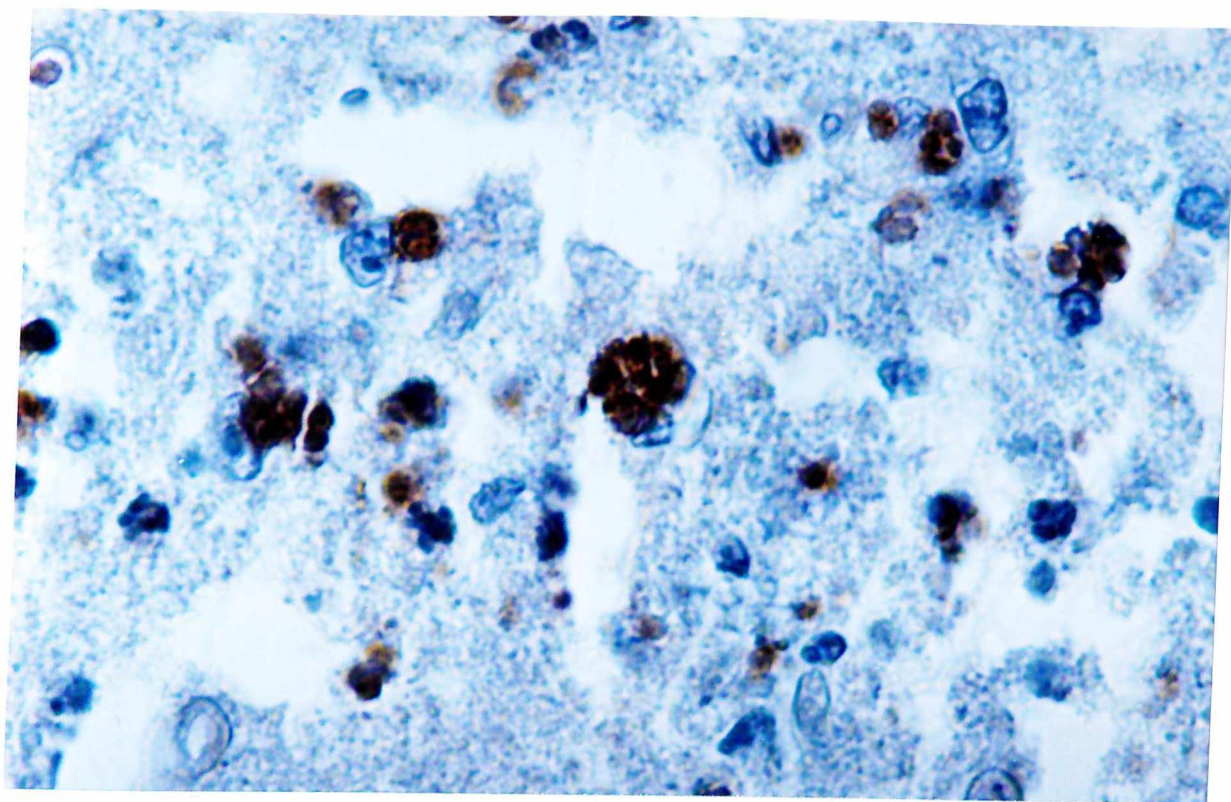


Figura 24 - Expressão do antígeno de tachizoíta P22, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de IFN- γ durante 9 dias, 290x.

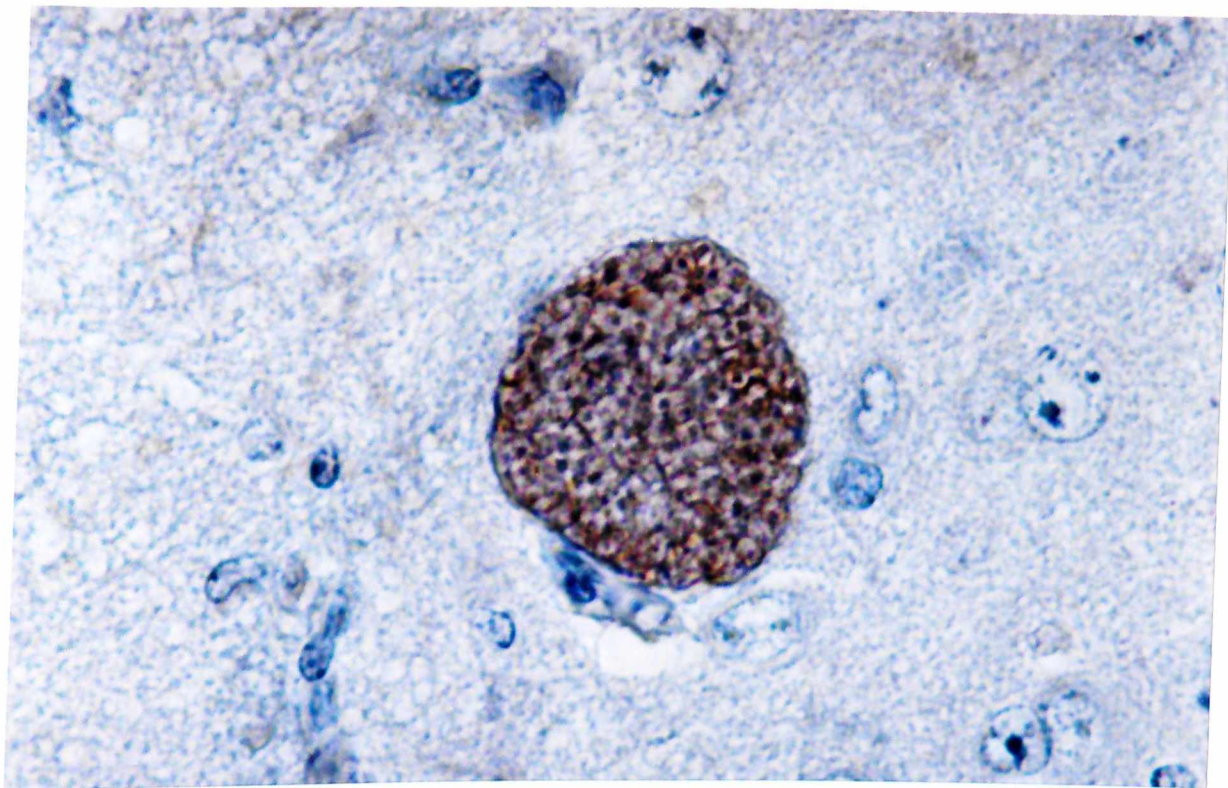
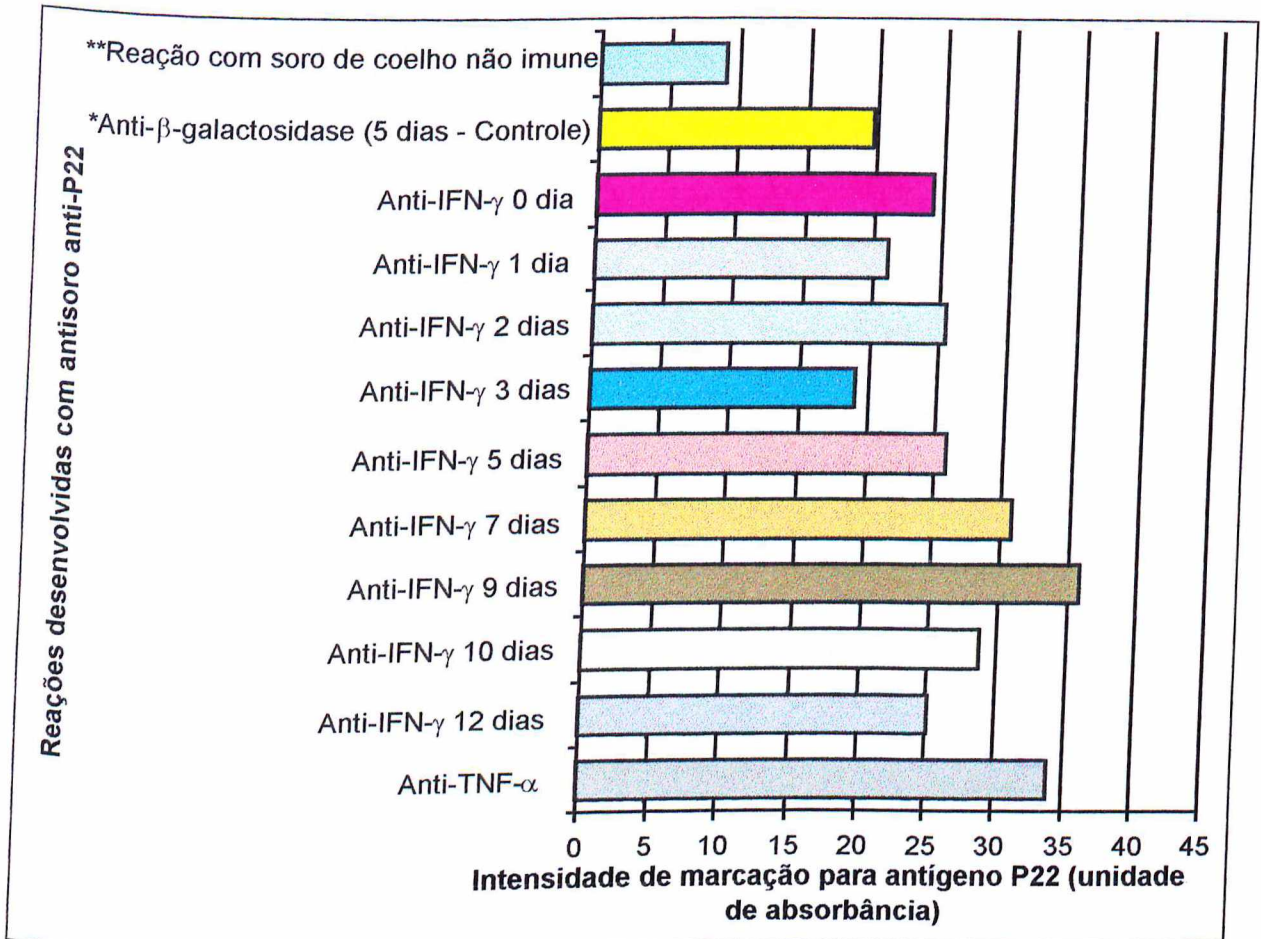


Figura 25 - Expressão do antígeno de tachizoíta P22, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de TNF- α durante 12 dias, 290x.

À análise fotométrica reações desenvolvidas com antisoro anti-P22, foram marcadas positivamente, desde animais não neutralizados de IFN- γ até animais neutralizados por 12 dias e neutralizados de TNF- α , confirmando a presença de antígeno de taquizoíta (P22) nos cistos (Figura 26). A quantificação da intensidade de coloração demonstrou que não houve diferença estatística entre os animais que não sofreram neutralização de IFN- γ e os animais que sofreram neutralização durante 12 dias ($p = 0,4196$).



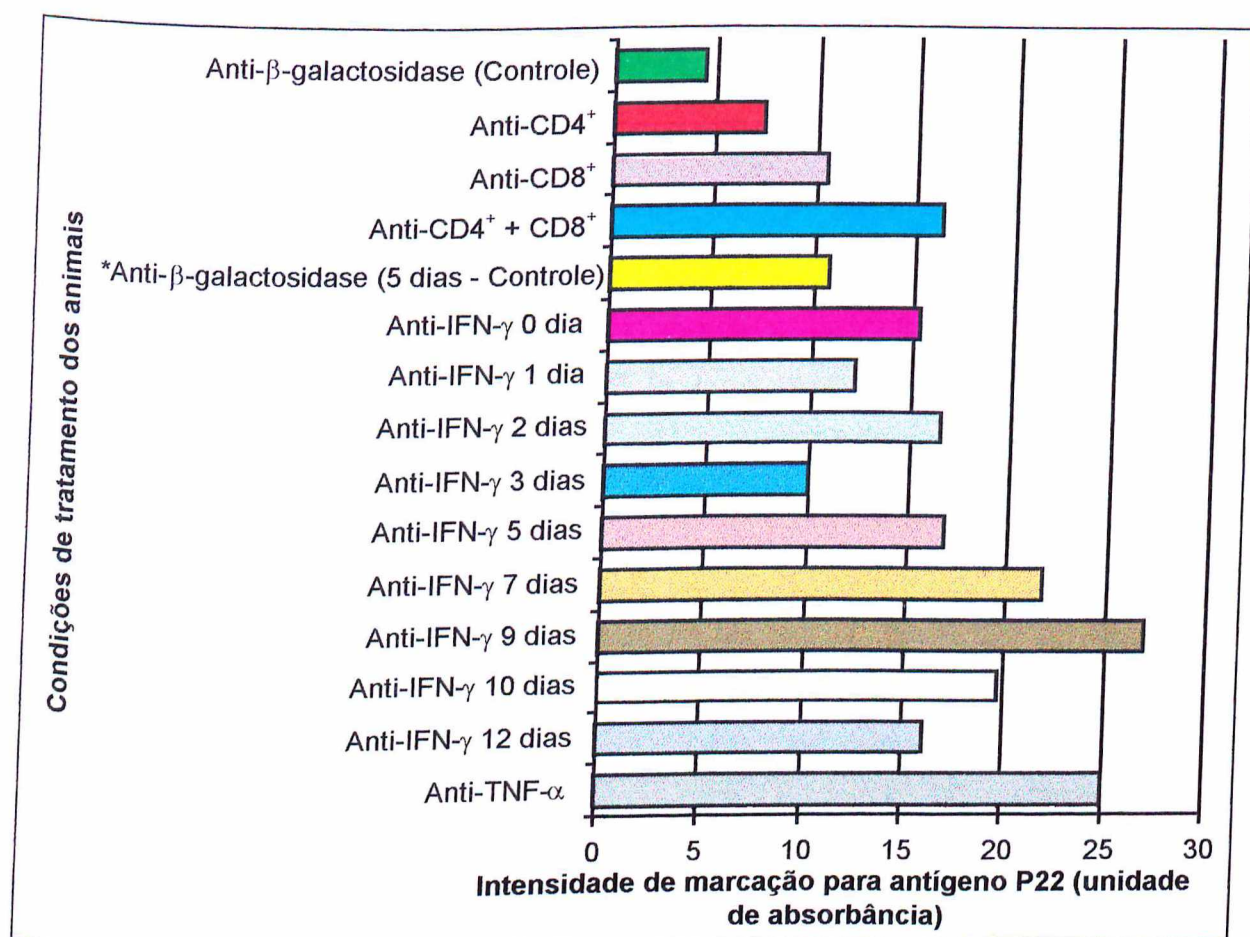
** Controle da reação

* Valores representativos de 2 animais apenas

Figura 26- Detecção do antígeno P22, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por neutralização de IFN- γ ou TNF- α .

Animais que foram neutralizados de $\text{TNF-}\alpha$, apresentaram marcação dos cistos para a proteína P22 maior que os neutralizados de $\text{IFN-}\gamma$ durante 12 dias, e esta foi estatisticamente significativa ($p = 0,0052$).

Não foi observada diferença estatística significativa de marcação nos cistos cerebrais de animais tratados com anticorpo monoclonal anti- CD4^+ e CD8^+ com aqueles neutralizados de $\text{IFN-}\gamma$ por 7, 9 ou 12 dias ($p = 0,4782$), mas esta diferença foi significativa quando os animais foram neutralizados de $\text{TNF-}\alpha$ ($p = 0,0219$) (Figura 27).



* Valores representativos de 2 animais apenas

Figura 27- Detecção do antígeno P22, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou TCD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN-γ ou TNF-α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.6.5) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA A PROTEÍNA DE “STRESS” DE 70 kDa NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL DE COELHO ANTI-Hsp70 E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Ao microscópio de luz, animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ apresentaram cistos cerebrais com coloração castanha de alguns parasitas (Figuras 28 e 29). Em animais tratados com anticorpo monoclonal controle, também observou-se coloração de alguns parasitas presentes nos cistos (Figura 30), sendo que em alguns cistos a marcação foi mais fraca e outros não apresentaram coloração. À fotometria observou-se que os valores de intensidade de marcação nas reações desenvolvidas com antisoro anti-Hsp, em cistos de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ e animais tratados com anticorpo monoclonal controle foram maiores que os de reações desenvolvidas com soro de coelho não imune (Figura 31). Esta diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa em animais tratados com anticorpo monoclonal controle ($p = 0,1785$). Em animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, a marcação dos parasitas por análises fotométricas, foi específica, quando se comparam estas reações com aquelas desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0265$).

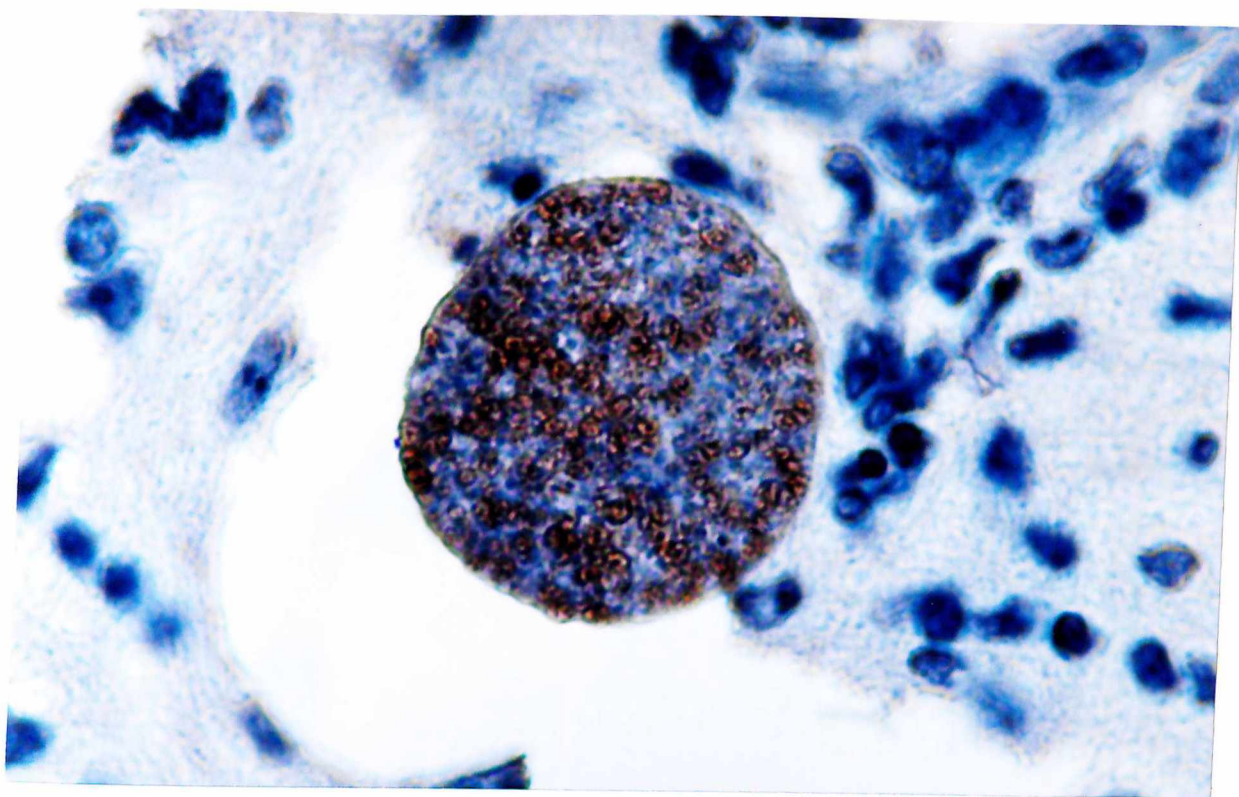


Figura 28 - Expressão da proteína de “stress” de 70 kDa, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺, 290x.

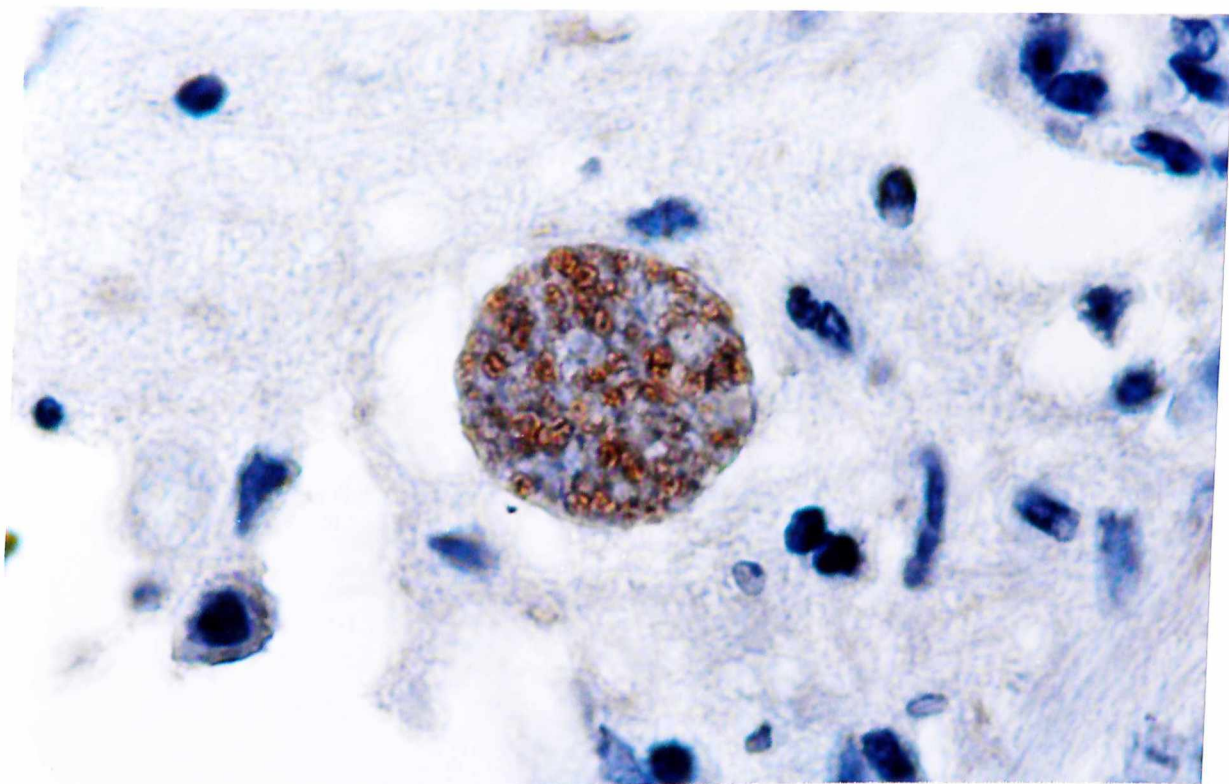


Figura 29 - Expressão da proteína de “stress” de 70 kDa, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, 290x.

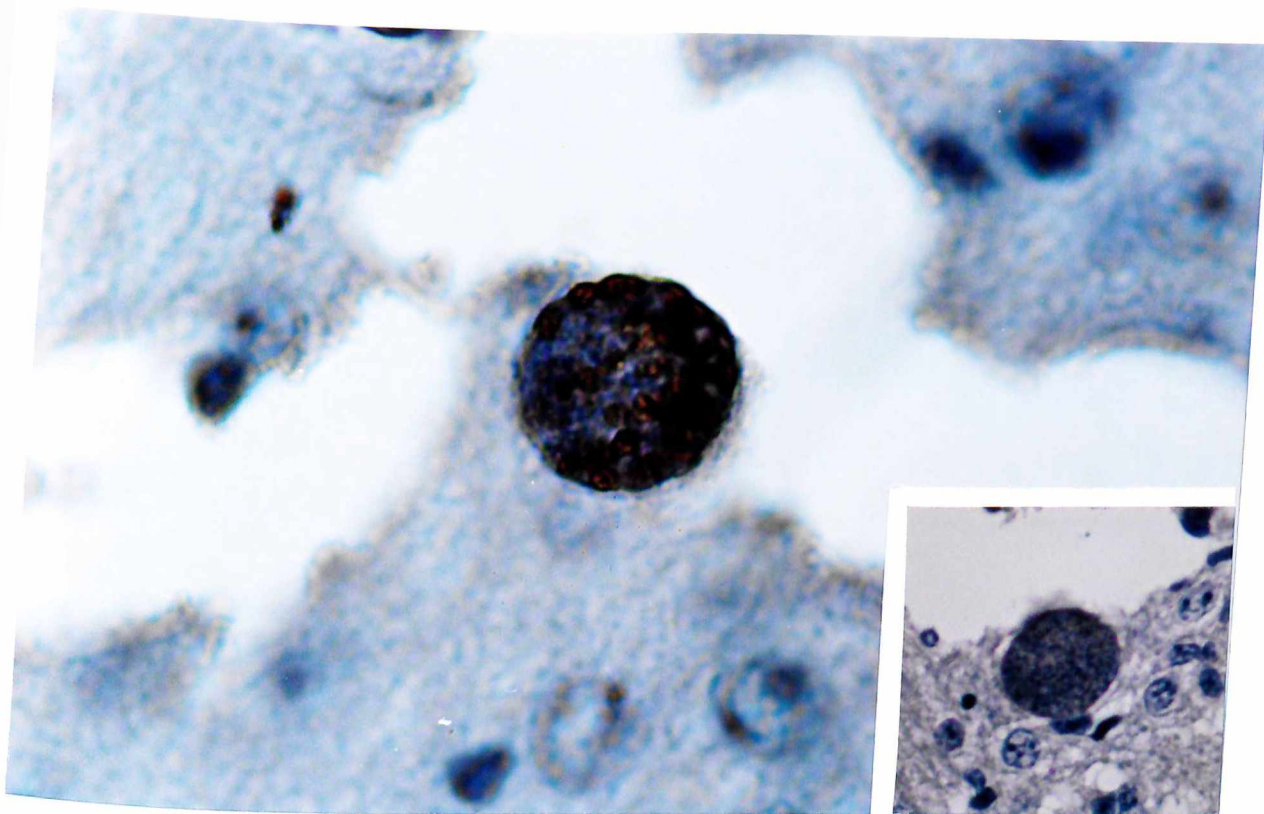
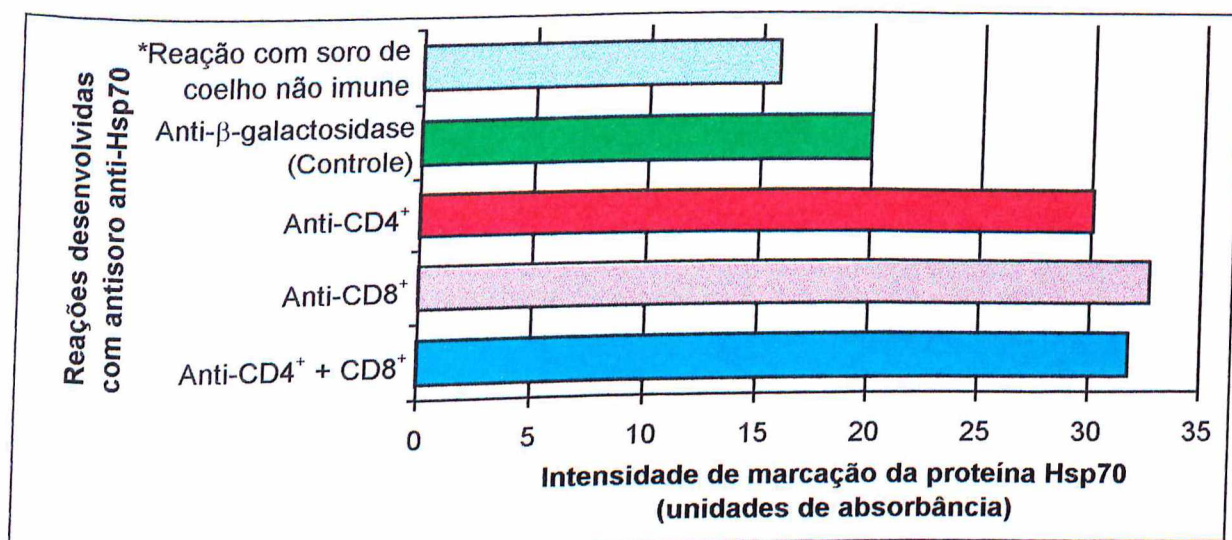


Figura 30 - Expressão da proteína de "stress" de 70 kDa, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que foram tratados com anticorpo monoclonal controle, anti- β -galactosidase, 290x. Canto inferior direito, reação desenvolvida com soro de coelho não imune, detalhe, 120x.



* Controle da reação.

Figura 31- Detecção da proteína Hsp70, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

Quando os animais foram neutralizados de IFN- γ ou TNF- α , observou-se uma coloração castanha mais homogênea dos parasitas nos cistos, embora alguns cistos não apresentaram coloração (Figuras 32 e 33). A coloração com este antisoro apresentou-se tenue. Animais no dia zero, neutralizados de IFN- γ durante 7, 10 e 12 dias e neutralizados de TNF- α , apresentaram marcação específica para proteína Hsp70, como pode ser observado na Figura 34. Reações desenvolvidas com antisoro anti-Hsp70, foram estatisticamente diferentes daquelas desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0016$). A marcação para a proteína Hsp70 foi maior aos 7, 10 e 12 dias de neutralização de IFN- γ ou aos 12 dias de neutralização de TNF- α que no dia zero ($p \leq 0,0227$).

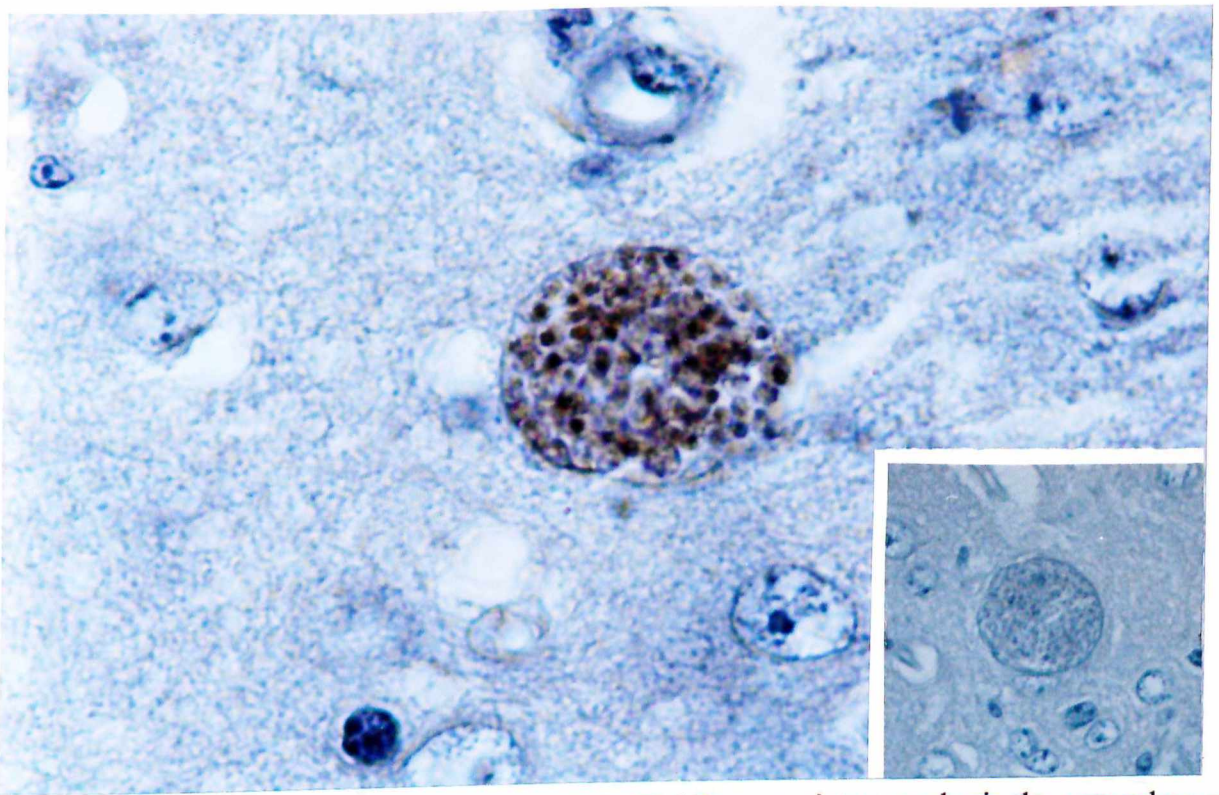


Figura 32 - Expressão da proteína de "stress" de 70 kDa, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de IFN- γ durante 7 dias, 290x. Canto inferior direito, reação desenvolvida com soro de coelho não imune, detalhe, 120x.

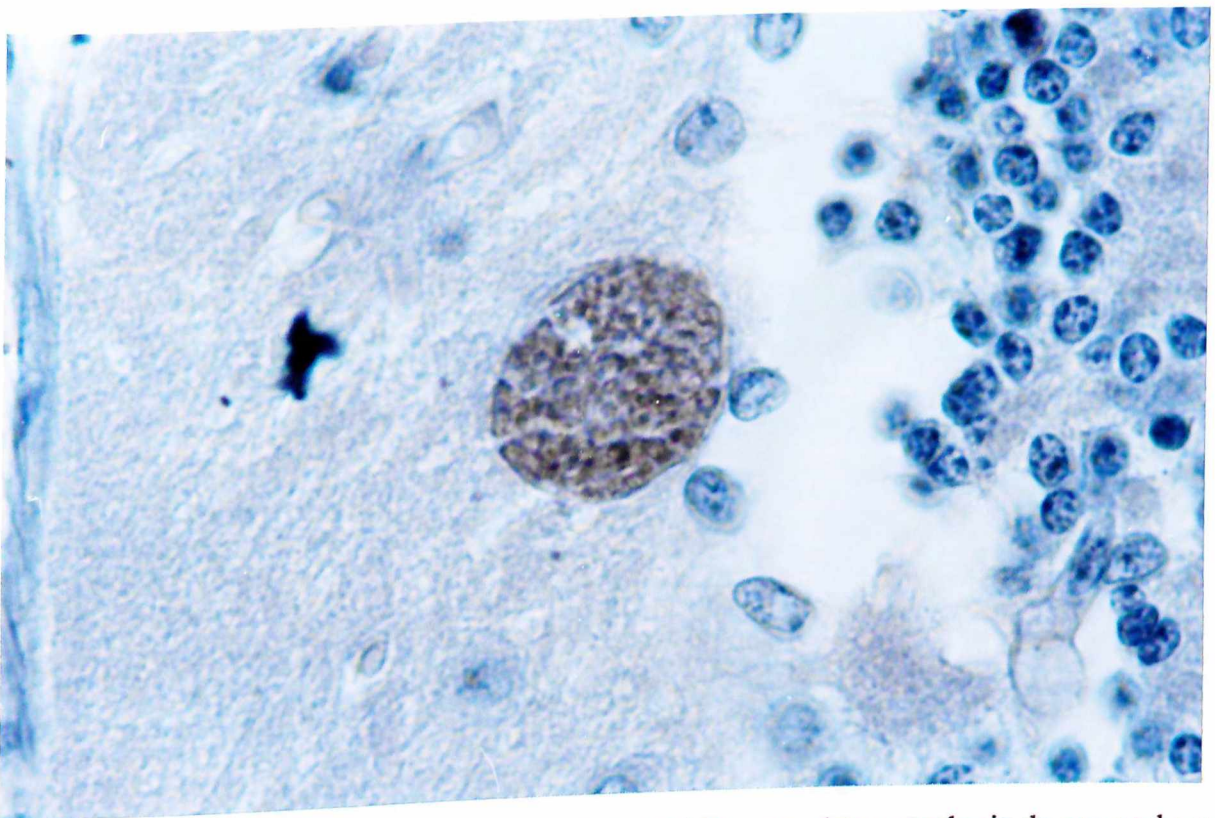
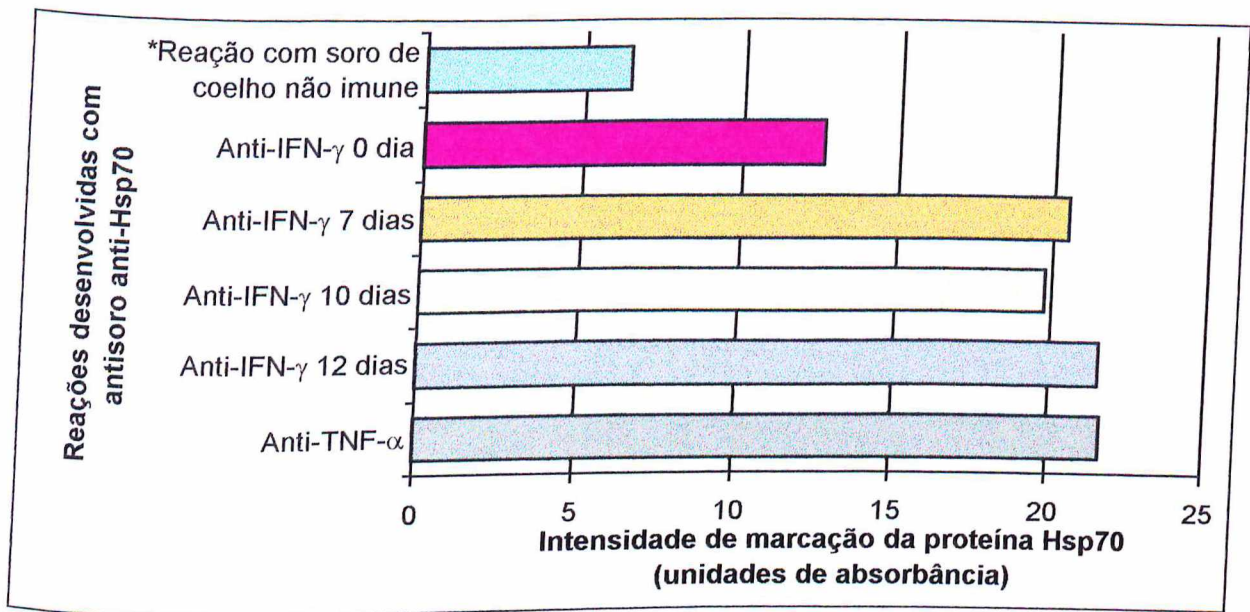


Figura 33 - Expressão da proteína de "stress" de 70 kDa, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de TNF- α durante 12 dias, 290x.

01370/97



* Controle da reação

Figura 34- Detecção da proteína Hsp70, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

Quando se compara animais neutralizados de IFN- γ e TNF- α com animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ (Figura 35), observa-se que não há diferença na intensidade de marcação dos cistos entre animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, com aqueles neutralizados de IFN- γ ou TNF- α por 12 dias ($p \geq 0,3320$).

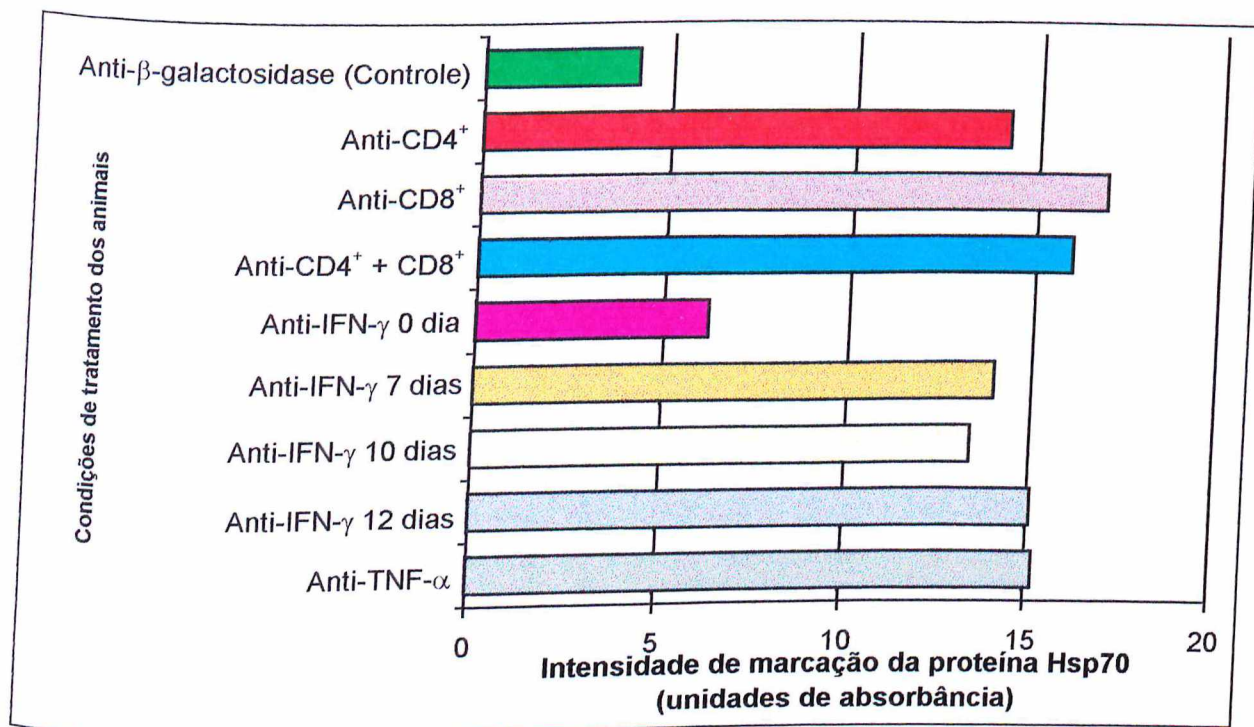


Figura 35- Detecção da proteína Hsp70, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os Valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN-γ ou TNF-α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.6.6) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANTÍGENO DA CEPA PJA NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL DE CAMUNDONGO ANTI-CEPA PJA E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Ao nível de microscopia de luz, cistos de animais que sofreram depleção de células T $CD4^+$ e/ou T $CD8^+$ apresentaram coloração castanha intensa de alguns parasitas, sendo que em animais que sofreram depleção de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$, alguns cistos apresentaram coloração de quase todos os parasitas (Figuras 36 e 37). Observou-se também coloração da parede de alguns cistos. Animais tratados com anticorpo monoclonal controle também apresentaram cistos com parasitas intensamente corados (Figura 38), sendo esta marcação em alguns cistos menos intensa. Pela análise fotométrica, foi observado que os cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T $CD4^+$ e/ou T $CD8^+$, apresentaram marcação positiva para antígeno da cepa PJA. É o que se observa quando se compara reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa PJA no tecido de tais animais com reações desenvolvidas com soro de camundongo não imune ($p \leq 0,0383$). As reações desenvolvidas com antisoro dirigido para a cepa PJA em cistos de animais tratados nas diferentes condições de imunossupressão, não foram estatisticamente diferentes entre si ($p \geq 0,0616$), como pode ser observado na Figura 39.

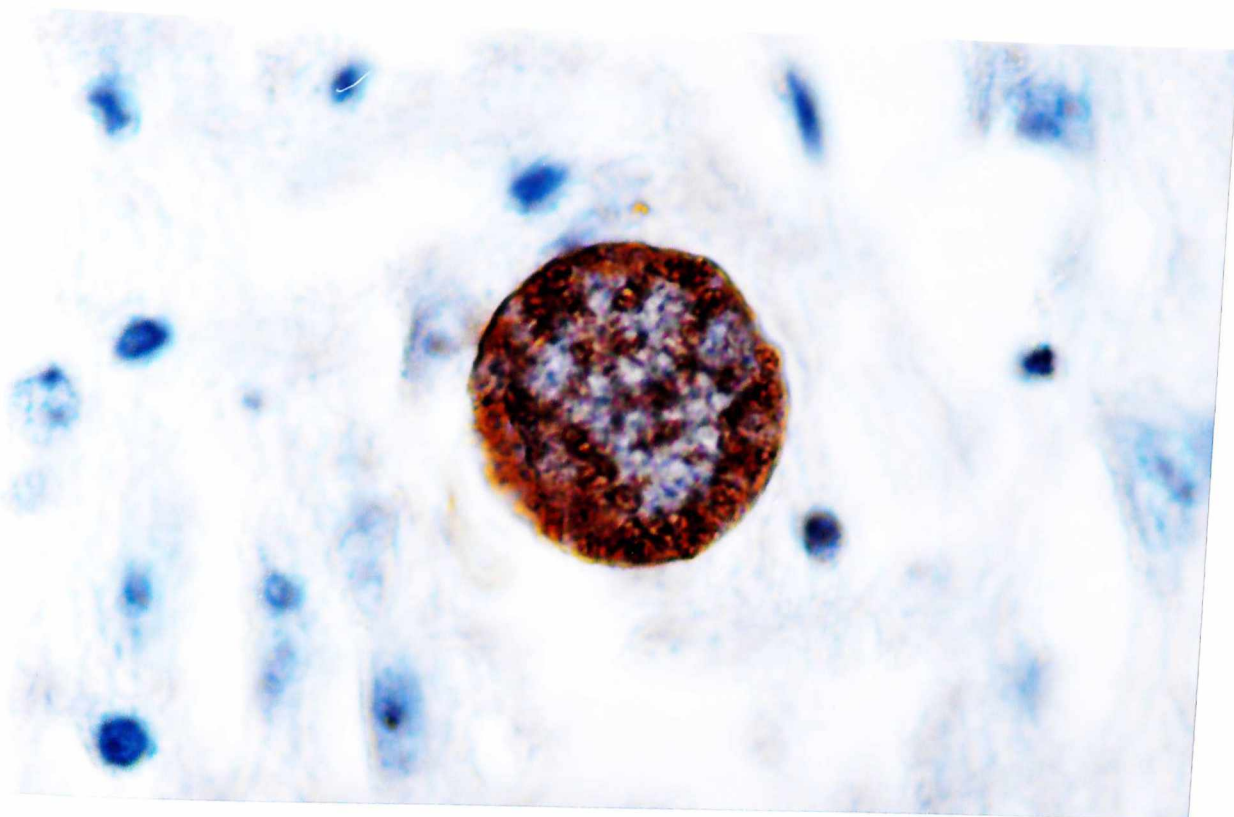


Figura 36 - Expressão de antígeno da cepa PJA, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺, 290x.

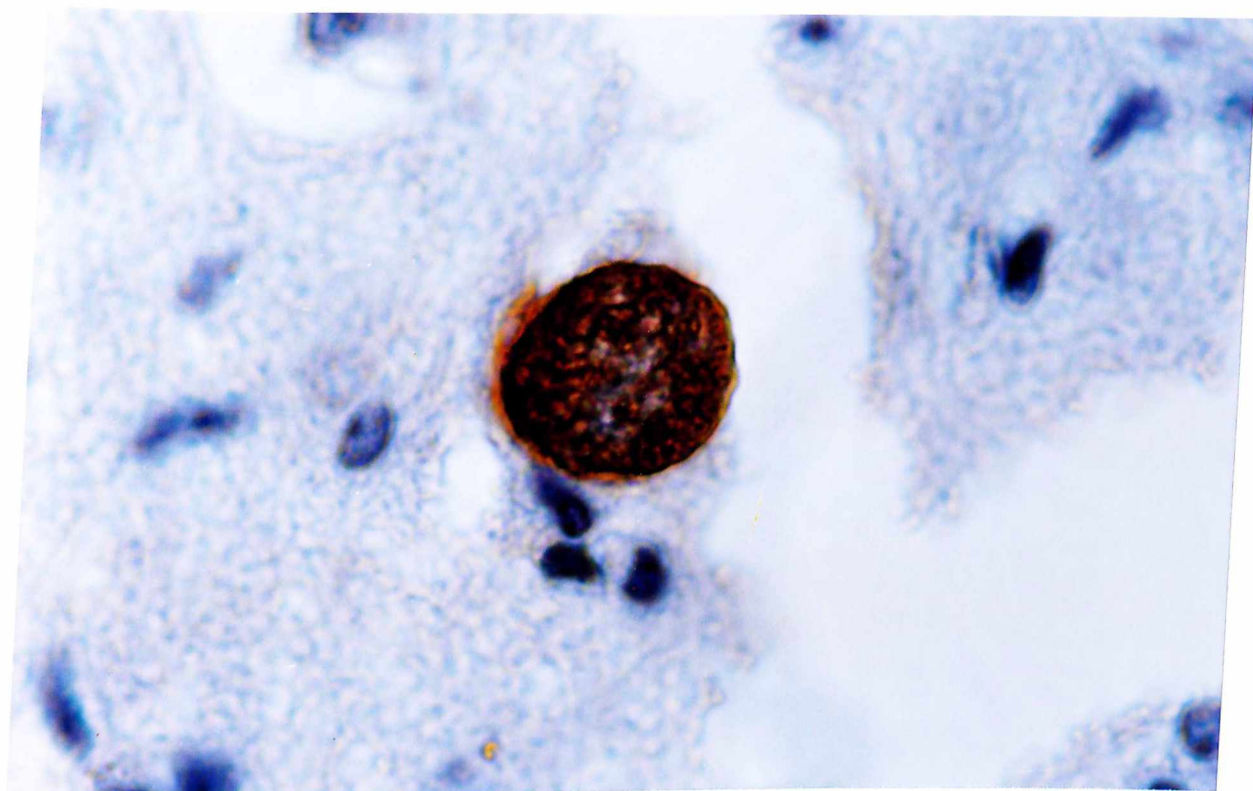


Figura 37 - Expressão de antígeno da cepa PJA, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, 290x.

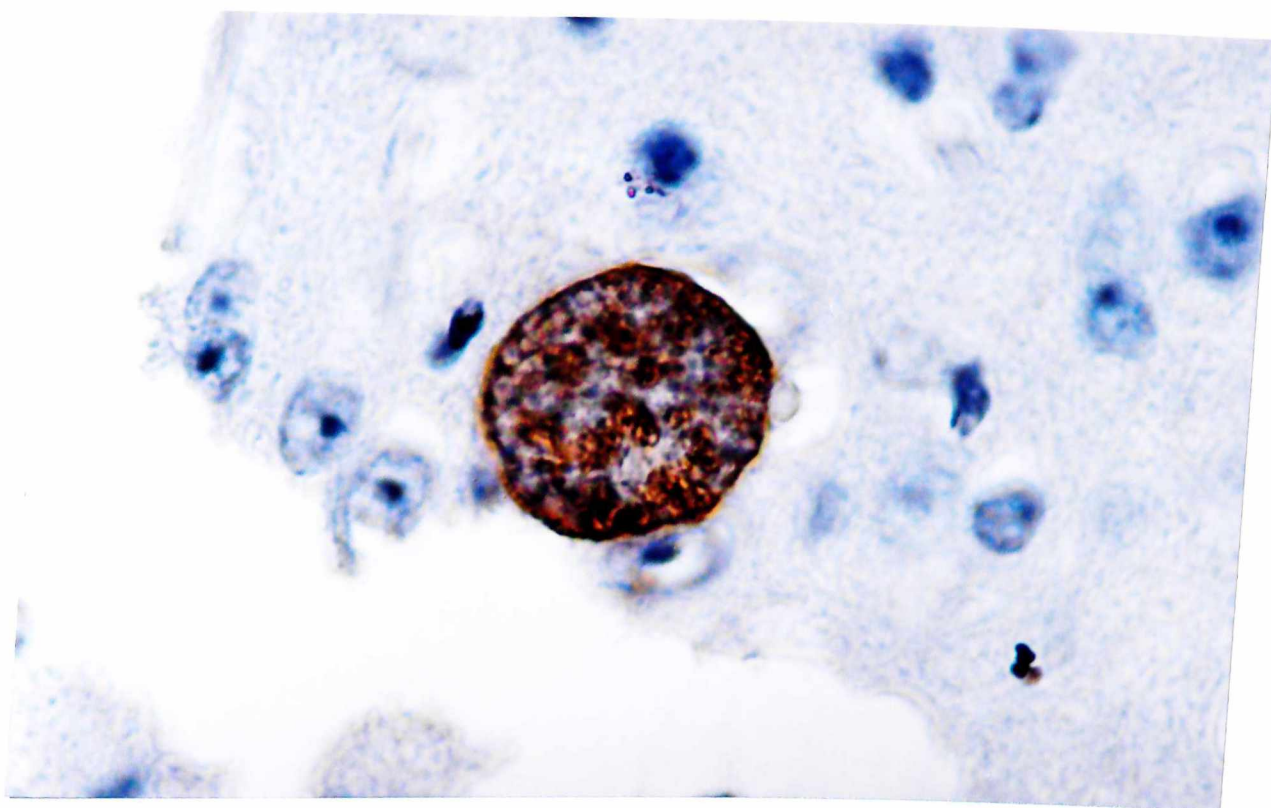


Figura 38 - Expressão de antígeno da cepa PJA, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que foram tratados com anticorpo monoclonal controle, anti- β -galactosidase, 290x.

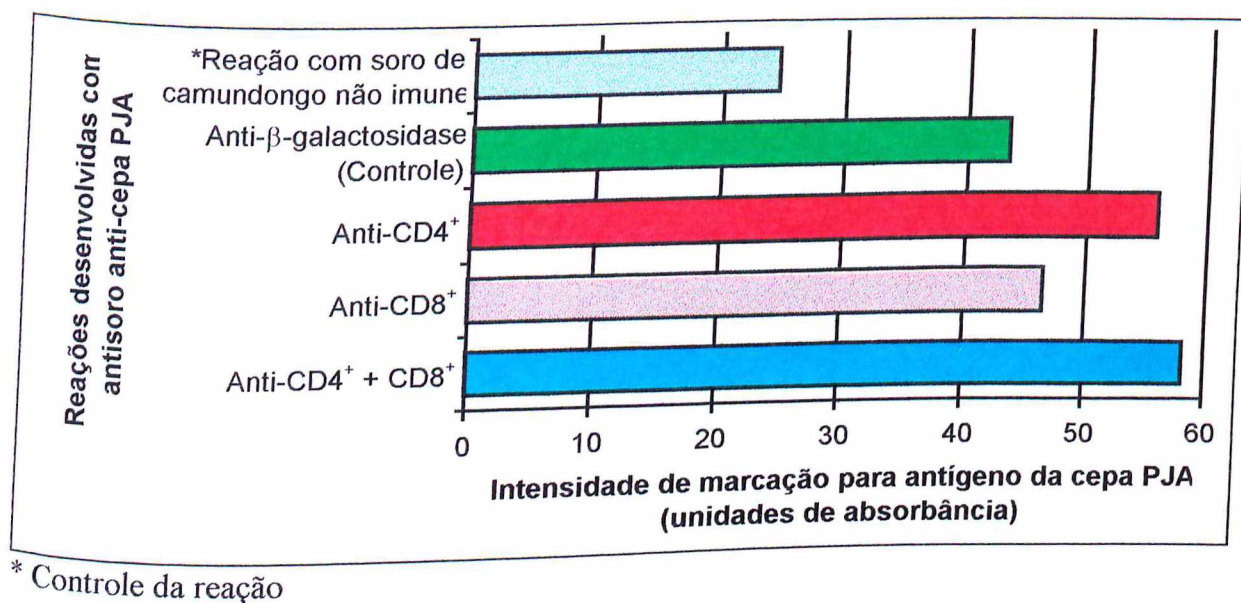


Figura 39- Detecção de antígeno da cepa PJA, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

Animais que sofreram neutralização de IFN- γ , no dia zero e aos 7 e 12 dias e animais neutralizados de TNF- α mostraram à microscopia de luz, uma coloração homogênea e intensa dos parasitas nos cistos (Figuras 40 e 41). À fotometria observou-se que não houve diferença estatística na intensidade de marcação entre os animais, neutralizados no dia zero e os neutralizados por 12 dias ($p = 0,0858$), mas a intensidade de marcação foi maior em animais neutralizados durante 7 dias quando comparados com animais neutralizados no dia zero ($p = 0,0344$). Cistos cerebrais de animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias apresentaram maior intensidade de marcação que animais neutralizados de TNF- α por 12 dias ($p < 0,0001$), como pode ser observado na Figura 42.

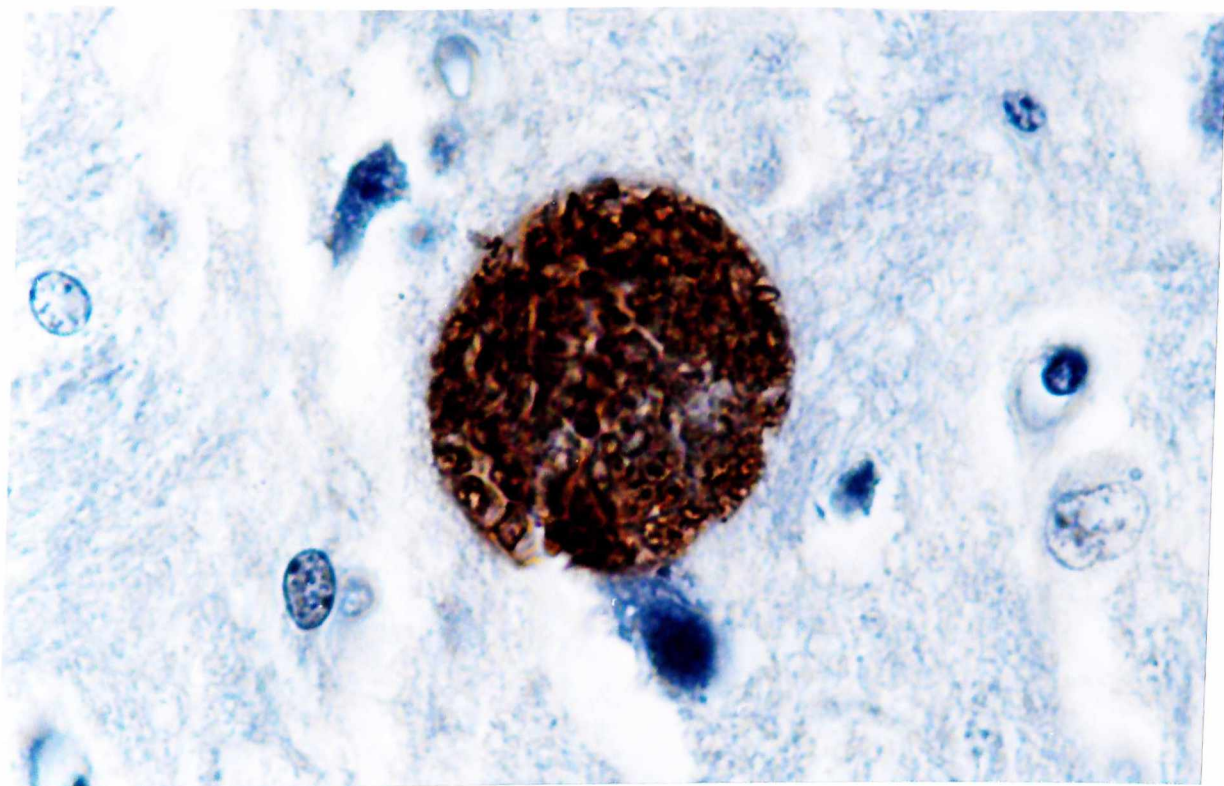


Figura 40 - Expressão de antígeno da cepa PJA, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que não sofreram neutralização de IFN- γ (dia zero), 290x.

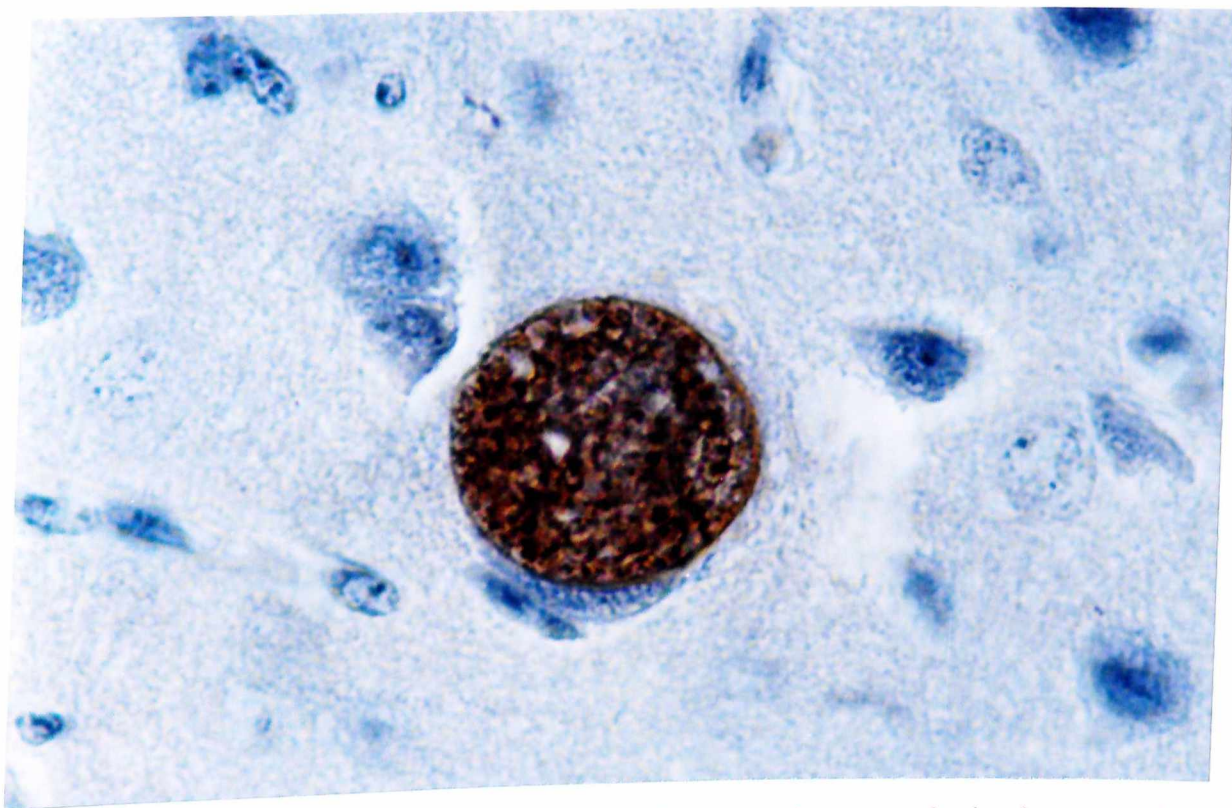


Figura 41 - Expressão de antígeno da cepa PJA, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de TNF- α durante 12 dias, 290x.

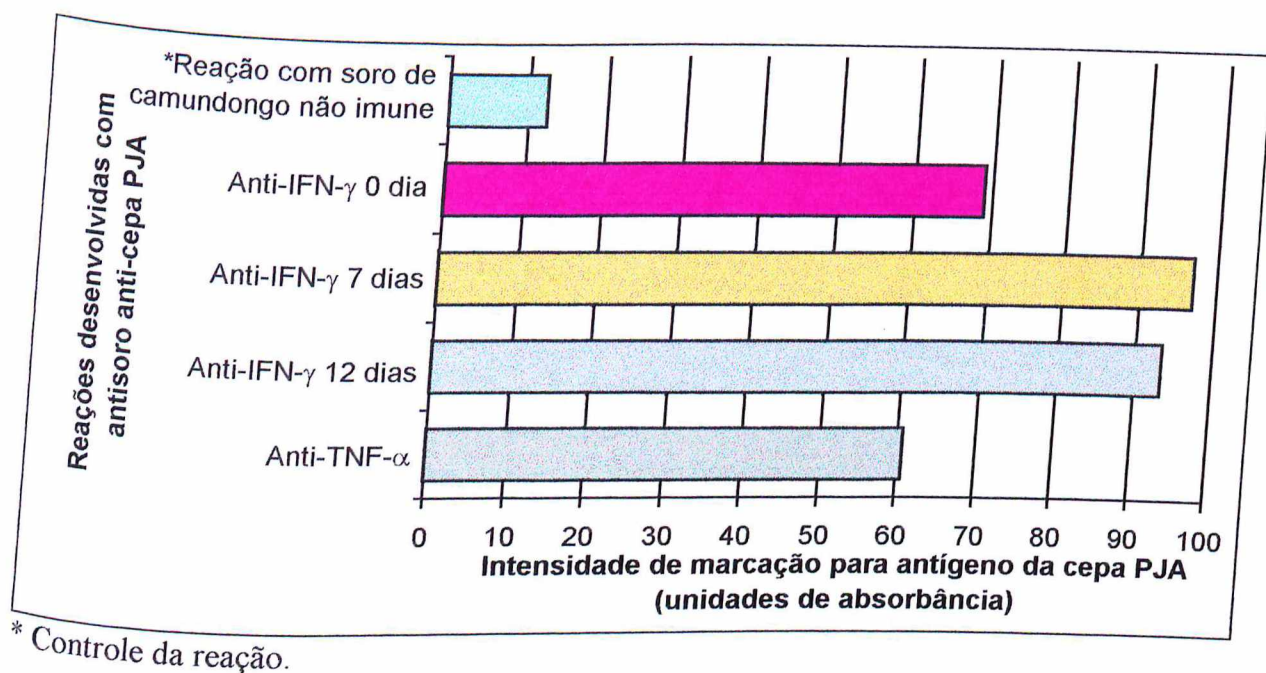


Figura 42- Detecção de antígeno da cepa PJA, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

A Figura 43 demonstra que reações em tecidos cujo fixador utilizado foi Bouin-Hollande (tecidos de animais neutralizados de IFN- γ e TNF- α), apresentaram uma intensidade de marcação maior dos cistos cerebrais com antígeno da cepa PJA quando comparados com os animais, cujo tecido foi fixado em formol a 10%. É o que se observa quando se compara animais tratados com antisoro anti- β -galactosidase (tecidos fixados em formol a 10%) e animais no dia zero de neutralização (tecidos fixados em Bouin-Hollande) ($p = 0,0233$).

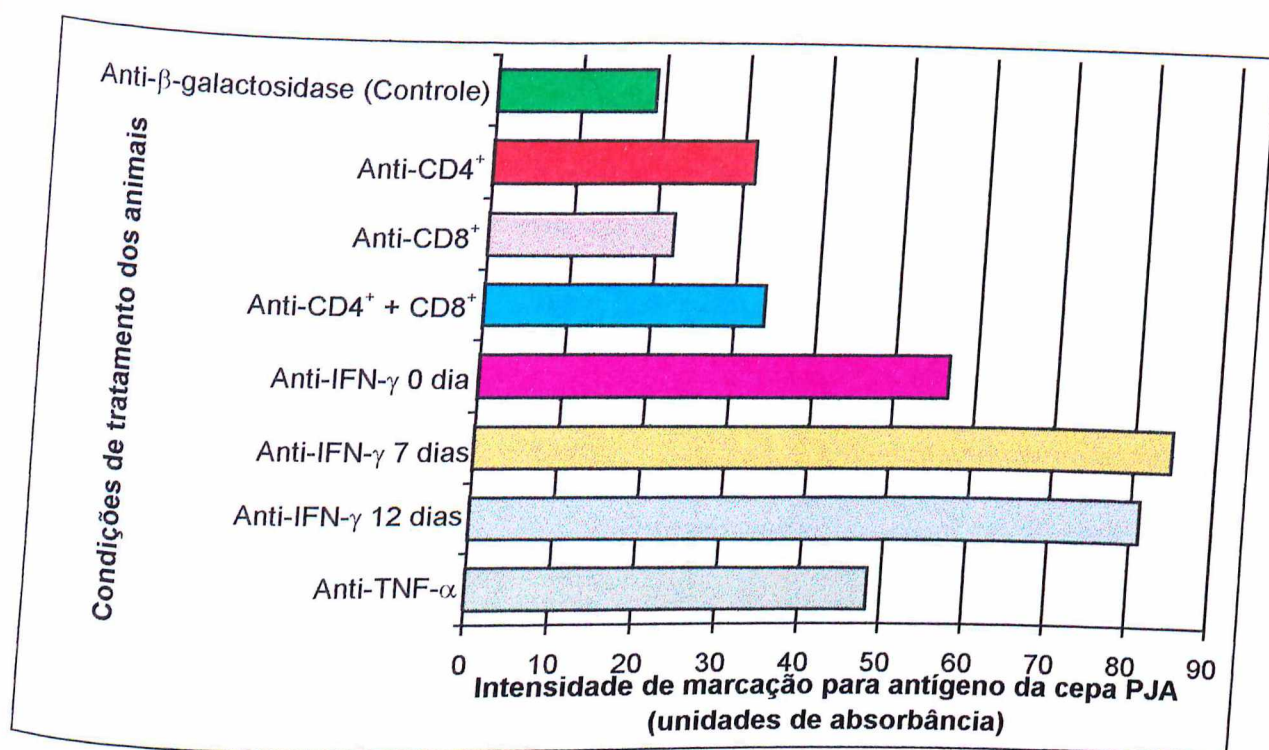


Figura 43- Detecção de antígeno da cepa PJA, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN-γ ou TNF-α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.6.7) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANTÍGENO DA CEPA RH NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL DE COELHO ANTI-CEPA RH E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Ao microscópio de luz, os cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ apresentaram parasitas heterogeneamente corados (Figuras 44 e 45). Quando o grau de imunossupressão se agravou, como em animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 46), alguns cistos apresentaram a maioria dos parasitas corados. Animais tratados com anticorpo monoclonal controle também apresentaram alguns parasitas corados nos cistos. A análise computadorizada dos cistos confirma a presença de antígenos da cepa RH nos parasitas contidos nestas estruturas. Em reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa RH, os cistos mostraram-se positivamente marcados, quando comparados com cistos de reações desenvolvidas com soro de coelho não imune (Figura 47). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,0100$).

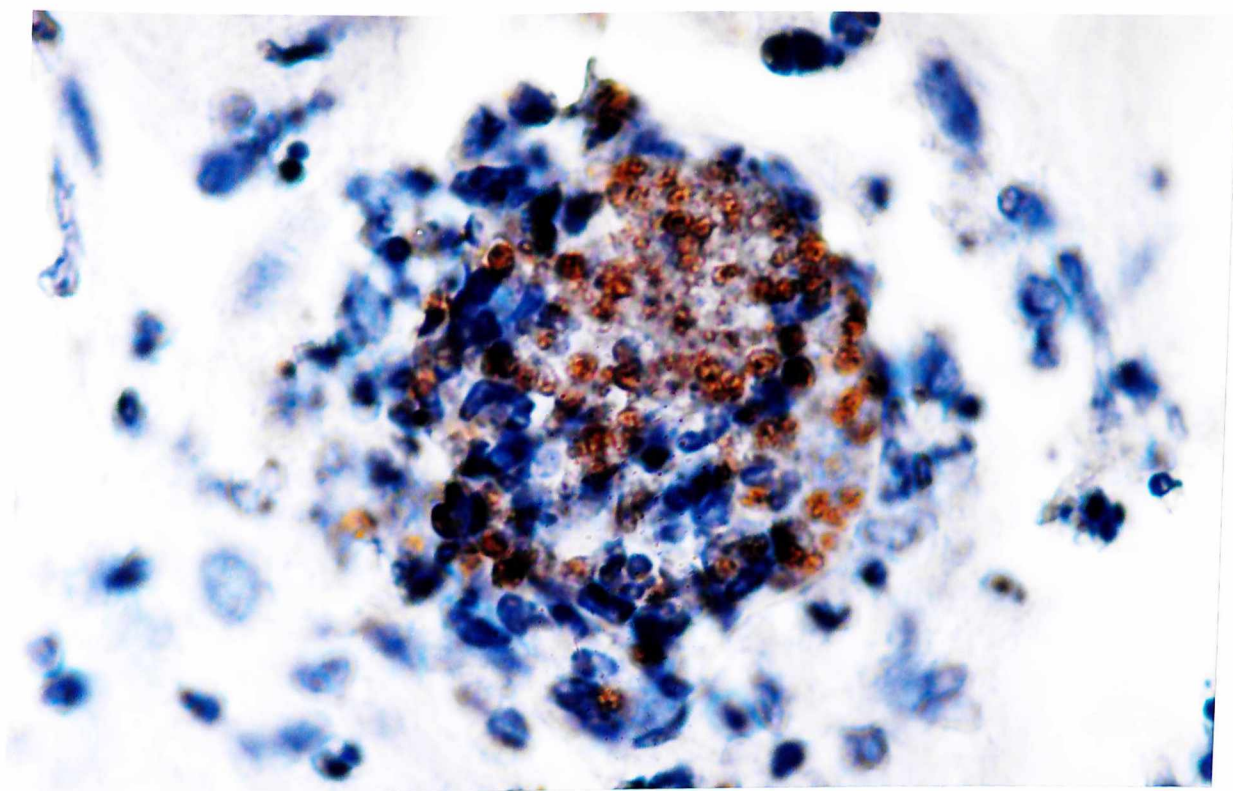


Figura 44 - Expressão de antígeno da cepa RH, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺, 290x.

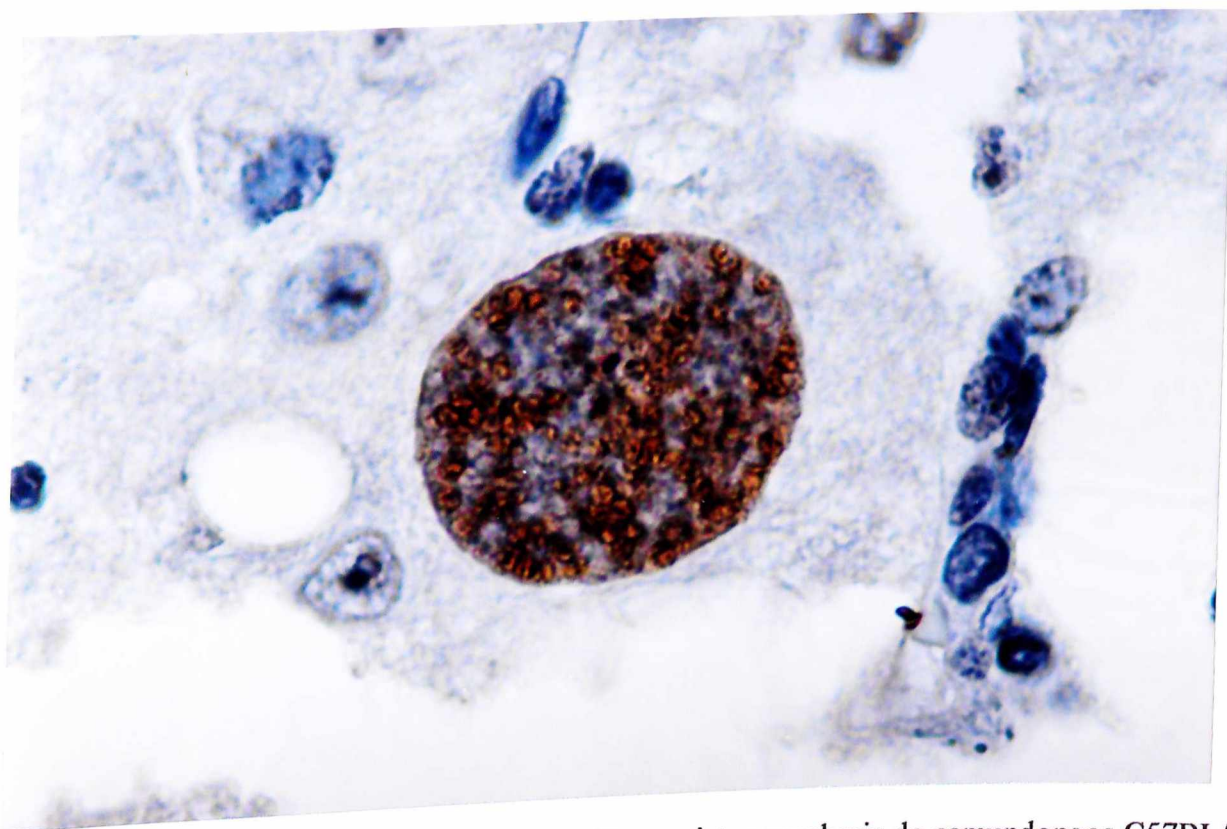


Figura 45 - Expressão de antígeno da cepa RH, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD8⁺, 290x.

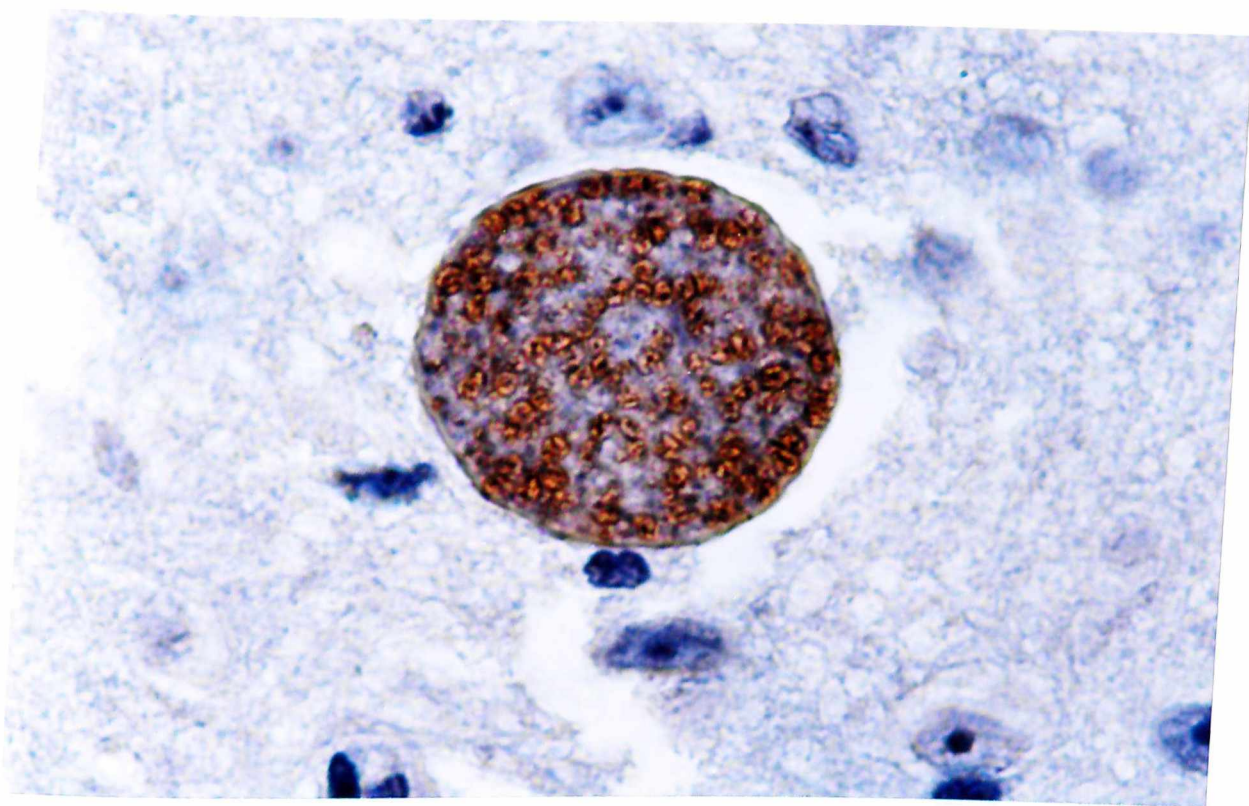
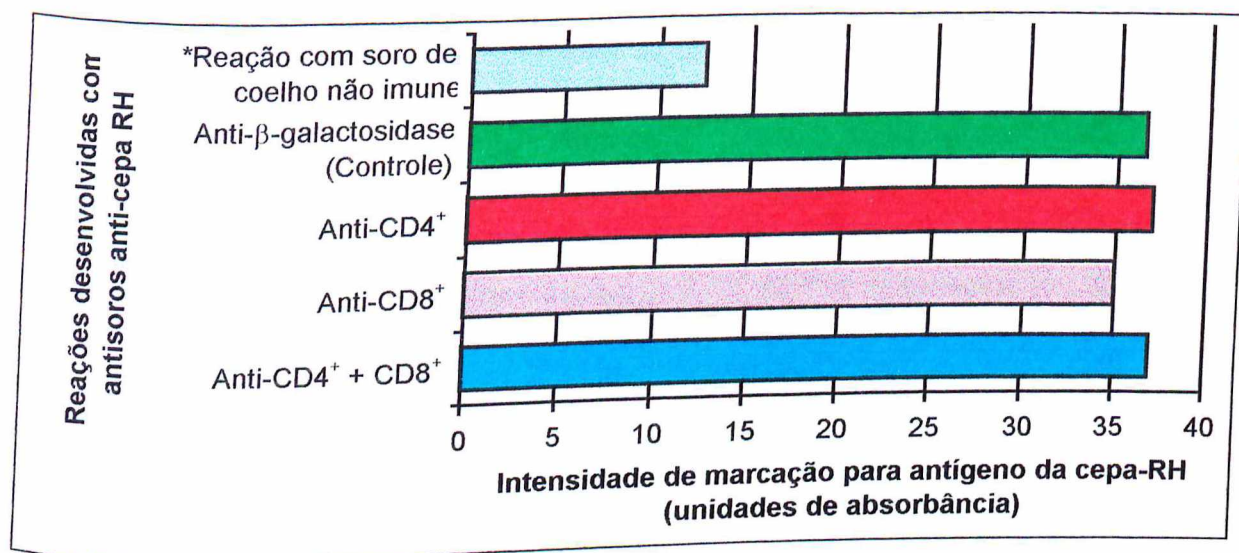


Figura 46 - Expressão de antígeno da cepa RH, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, 290x.



* Controle da reação.

Figura 47- Detecção de antígeno da cepa-RH, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

Animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α , apresentaram a maioria dos parasitas nos cistos corados. Animais neutralizados de IFN- γ no dia zero e durante 1, 7 e 12 dias ou neutralizados de TNF- α durante 12 dias, apresentaram coloração castanha intensa dos cistos cerebrais à microscopia de luz (Figura 48). Animais no dia zero de neutralização apresentaram coloração mais fraca nos cistos maiores e mais forte nos menores. À medida que a neutralização se prolongou, a coloração apresentou-se mais homogênea. A fotometria confirmou a marcação positiva para antígenos da cepa RH em animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α . Como pode ser demonstrado na Figura 49, reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa RH apresentaram valores para intensidade de marcação significativamente maiores que reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística na intensidade de marcação para antígeno da cepa RH entre animais no dia zero de neutralização, neutralizados durante 1, 7 e 12 dias e neutralizados de TNF- α durante 12 dias ($p \geq 0,0703$).

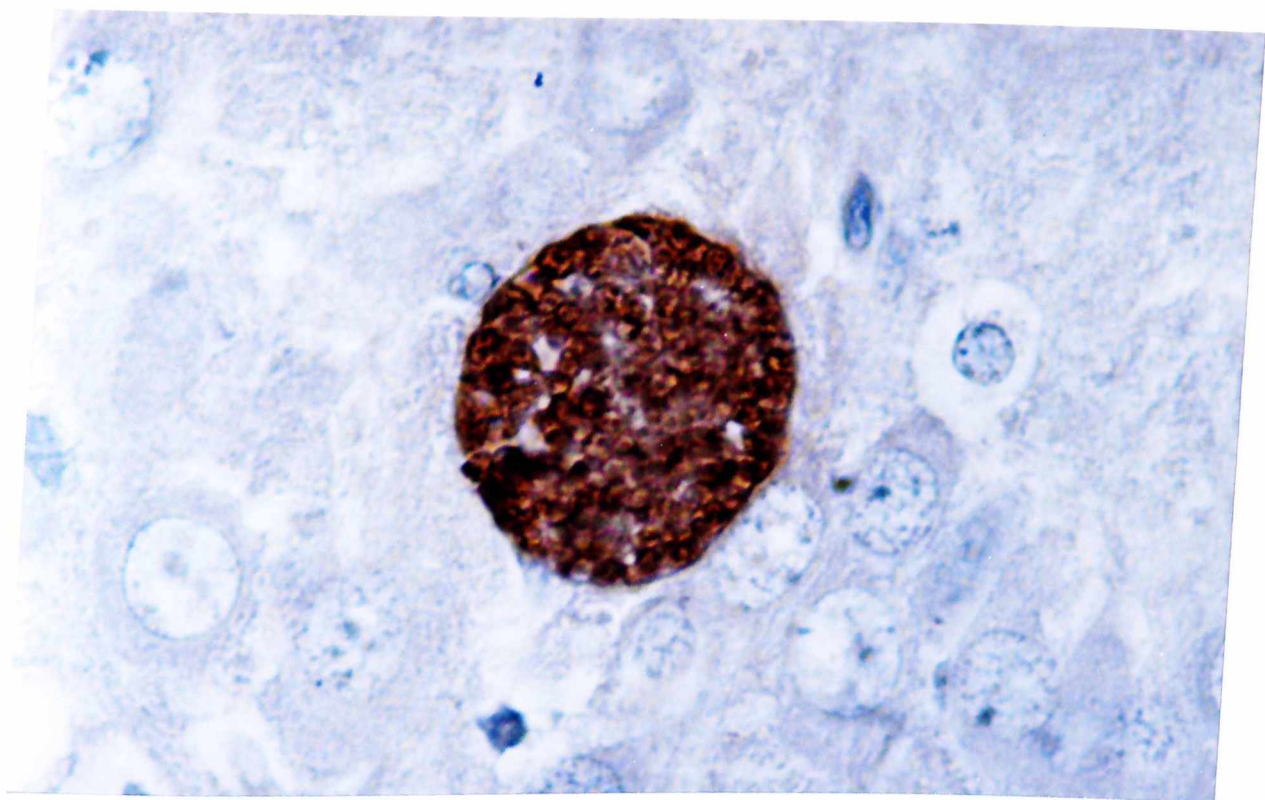
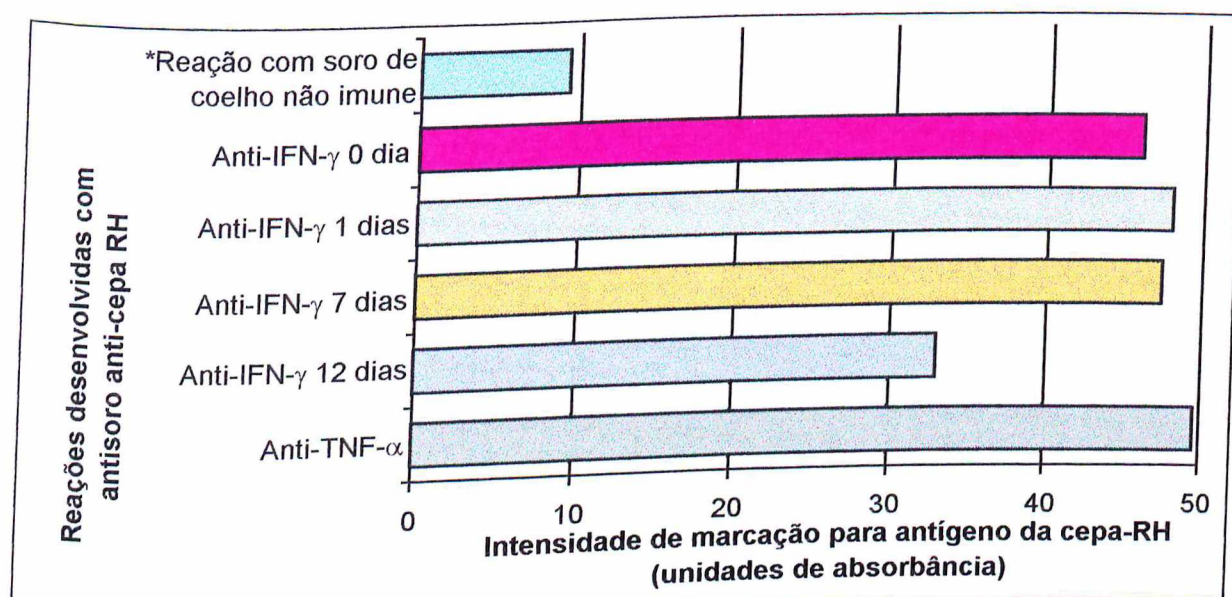


Figura 48 - Expressão de antígeno da cepa RH, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de IFN- γ por 1 dia, 290x.



* Controle da reação.

Figura 49- Detecção de antígeno da cepa-RH, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

A maioria das reações desenvolvidas em animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α apresentaram intensidade de marcação para antígeno da cepa RH maior que reações desenvolvidas em animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ (Figura 50). Animais que sofreram neutralização de TNF- α , apresentaram cistos cerebrais marcados com maior intensidade que os cistos de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ($p \leq 0,0202$), como pode ser demonstrado na Figura 50. Entretanto, cistos de animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias não apresentaram intensidade de marcação maior que animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ ($p = 0,4341$).

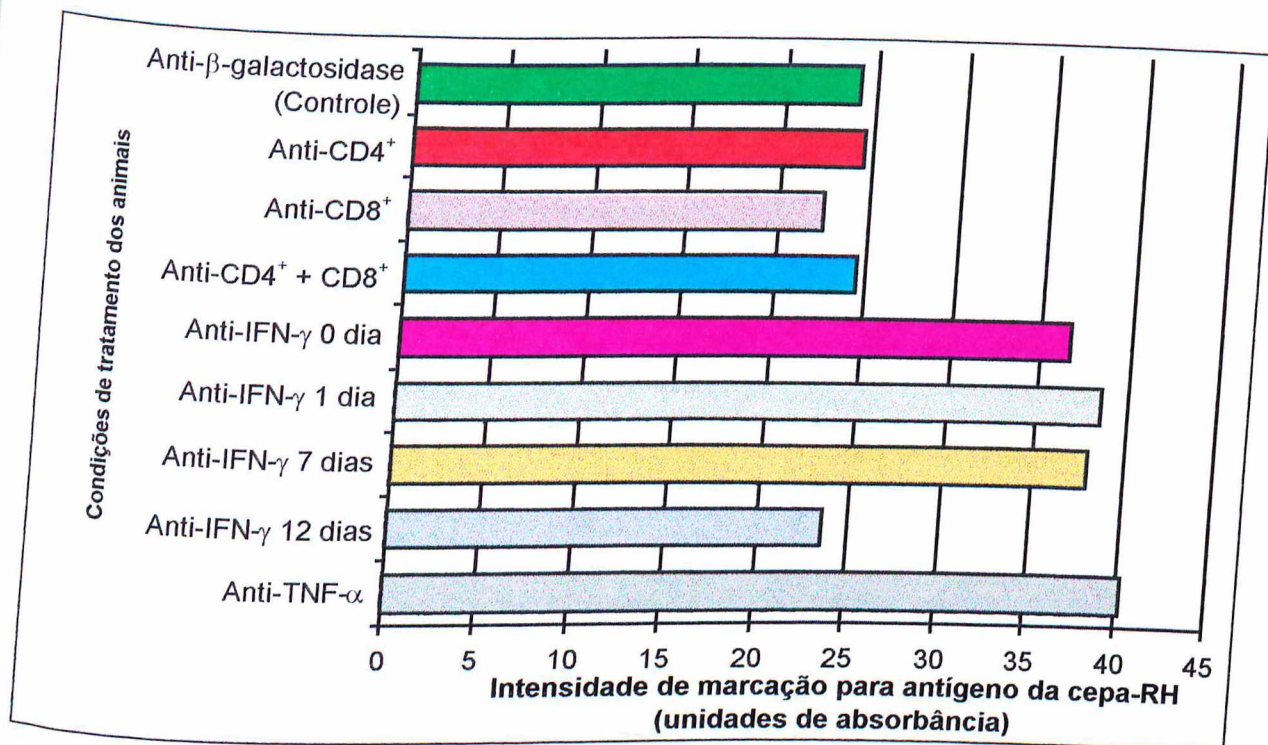


Figura 50- Detecção de antígeno da cepa-RH, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.6.8.) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANTÍGENO DA CEPA PLK NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL DE COELHO ANTI-CEPA PLK E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Alguns parasitas dentro dos cistos apresentaram coloração castanha à microscopia de luz. Animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, apresentaram um padrão de coloração semelhante (Figuras 51 e 52). Animais tratados com anticorpo monoclonal controle, também apresentaram alguns parasitas corados, embora alguns cistos não foram corados. À fotometria, reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa PLK, em cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, ou tratados com anticorpo monoclonal controle, apresentaram intensidade de marcação estatisticamente maior que reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0120$). Como pode ser observado na Figura 53, animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ou T CD4⁺ e T CD8⁺, apresentaram intensidade de marcação para antígeno da cepa PLK maior que animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ ($p \leq 0,0275$).

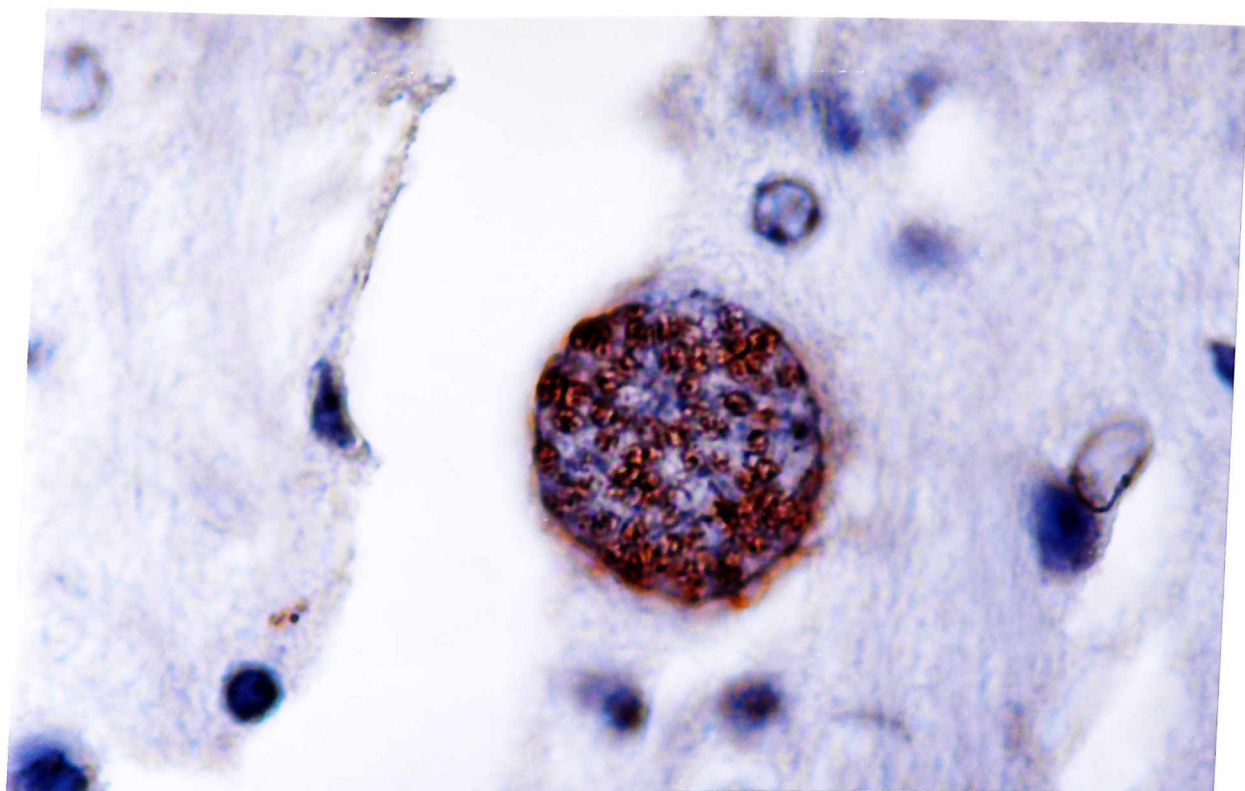


Figura 51 - Expressão de antígeno da cepa PLK, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺, 290x.

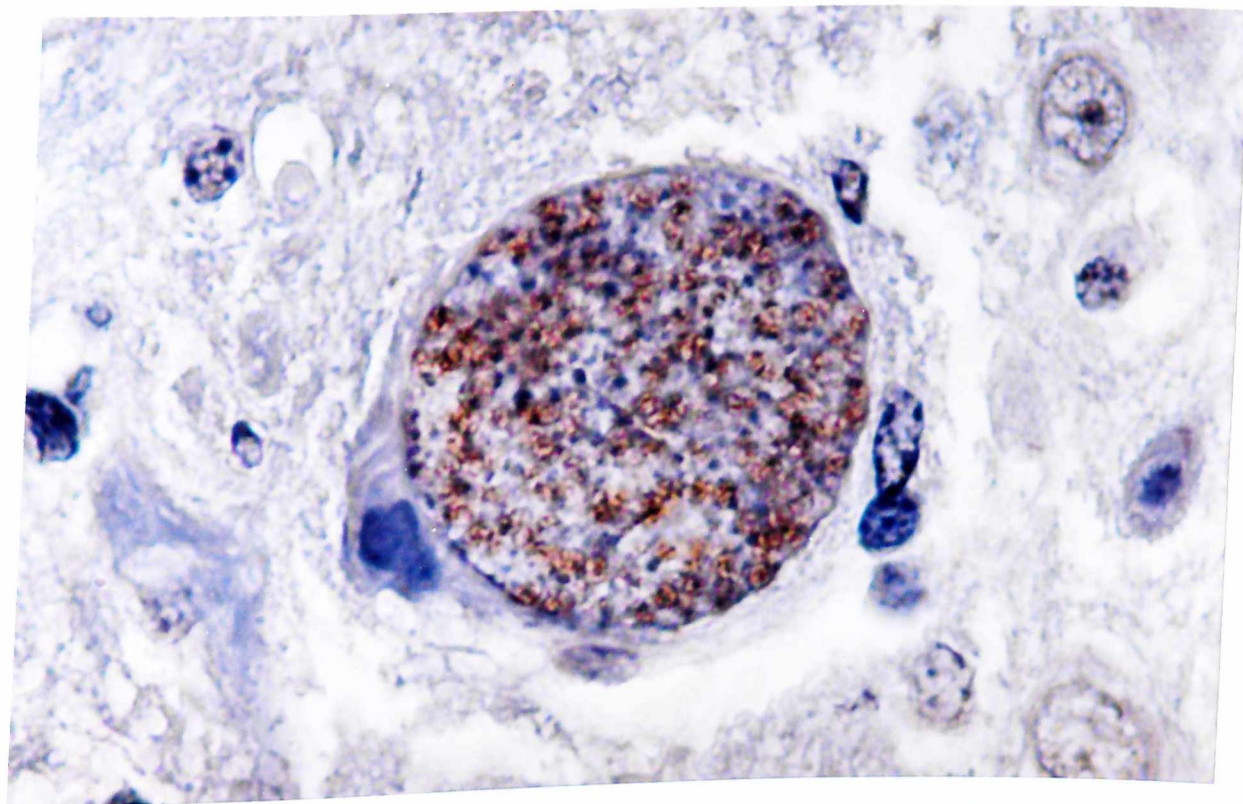
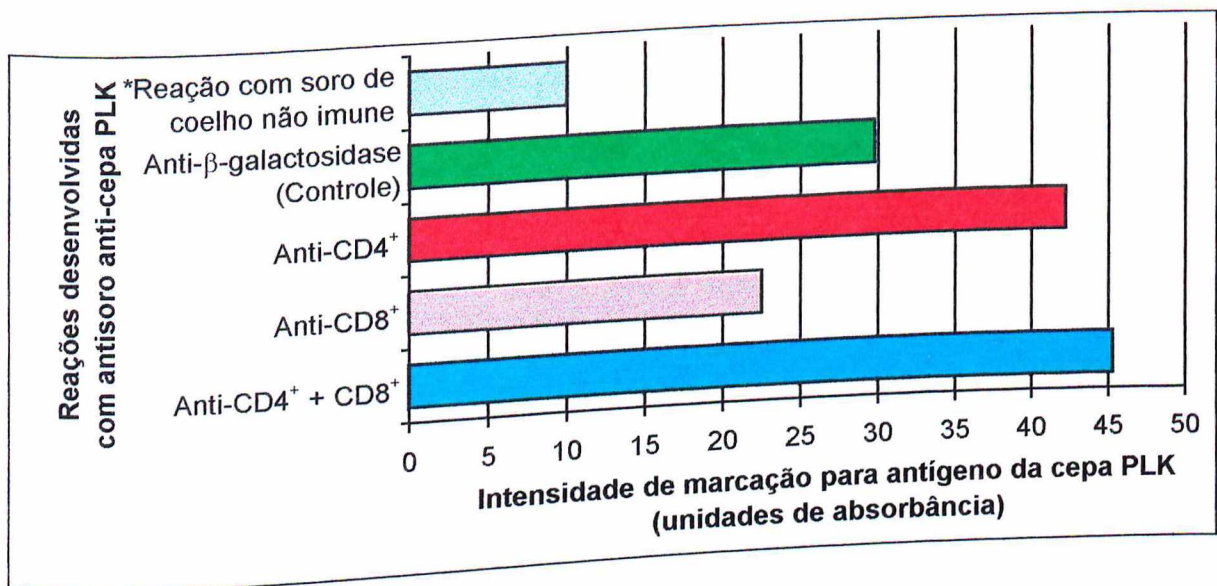


Figura 52 - Expressão de antígeno da cepa PLK, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD8⁺, 290x.



* Controle da reação.

Figura 53- Detecção de antígeno da cepa PLK, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

Animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α apresentaram a maioria dos parasitas nos cistos cerebrais corados. Animais no dia zero de neutralização, neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 12 dias ou neutralizados de TNF- α , apresentaram coloração semelhante dos parasitas à microscopia de luz (Figura 54). À análise fotométrica, reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa PLK em animais que foram neutralizados de IFN- γ no dia zero, por 7 e 12 dias e neutralizados de TNF- α apresentaram uma intensidade de marcação estatisticamente maior que reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0033$) (Figura 55). Animais neutralizados de IFN- γ durante 7 dias ou neutralizados de TNF- α , apresentaram uma intensidade de marcação para antígeno da cepa PLK, maior que animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias ($p \leq 0,0313$).

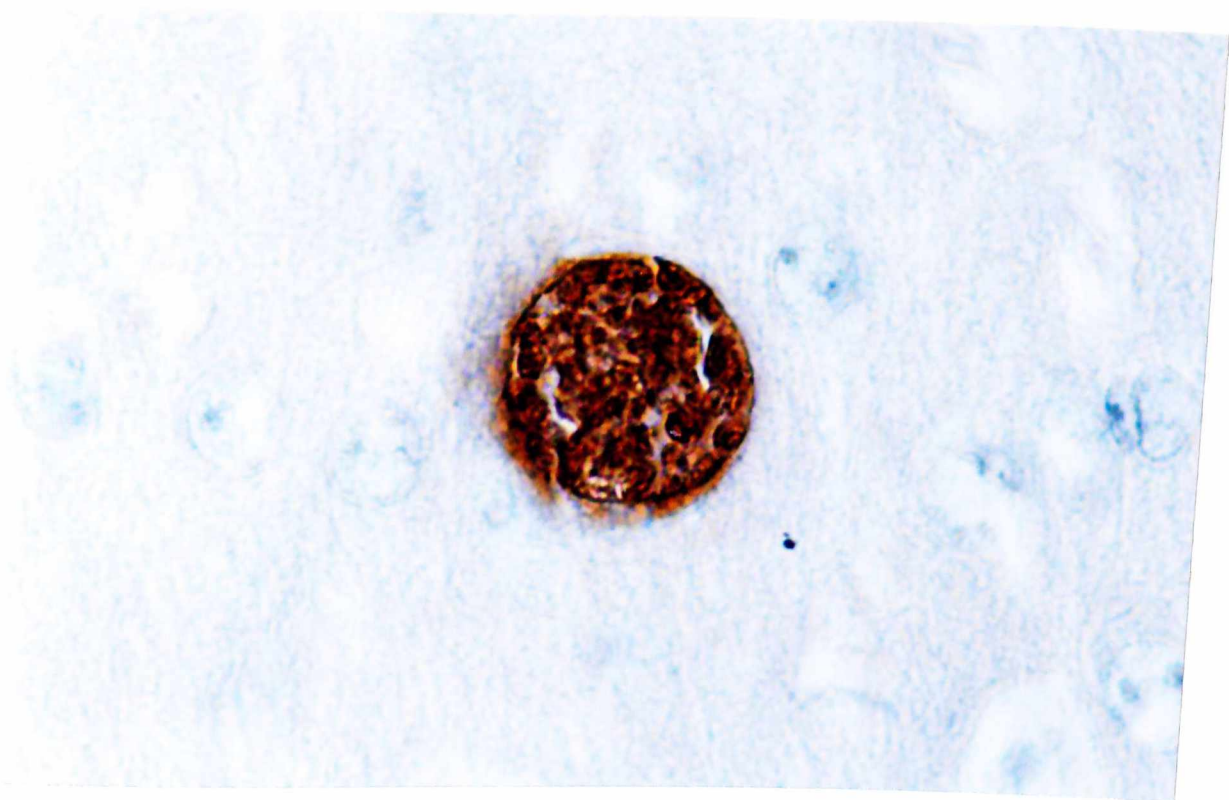
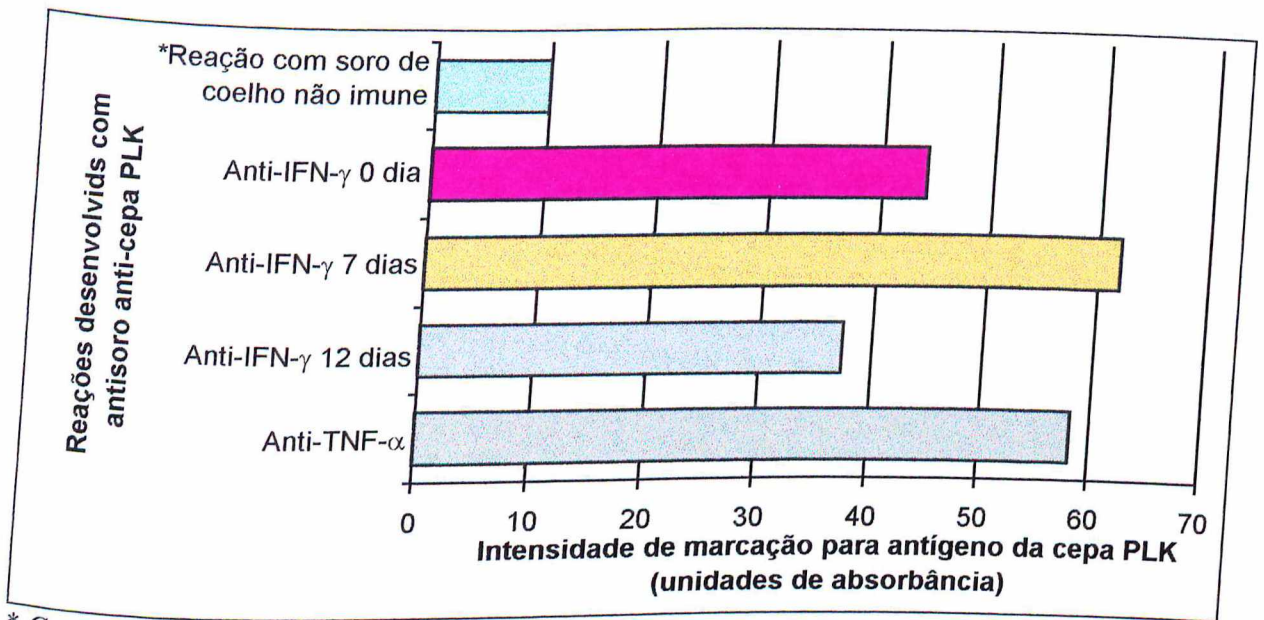


Figura 54 - Expressão de antígeno da cepa PLK, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de $\text{TNF-}\alpha$, 290x.



* Controle da reação.

Figura 55- Detecção de antígeno da cepa PLK, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

Animais neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 12 dias ou neutralizados de TNF- α não apresentaram diferença na intensidade de marcação de cistos cerebrais para antígeno da cepa PLK ($p \geq 0,0741$) em relação à marcação de cistos de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 56).

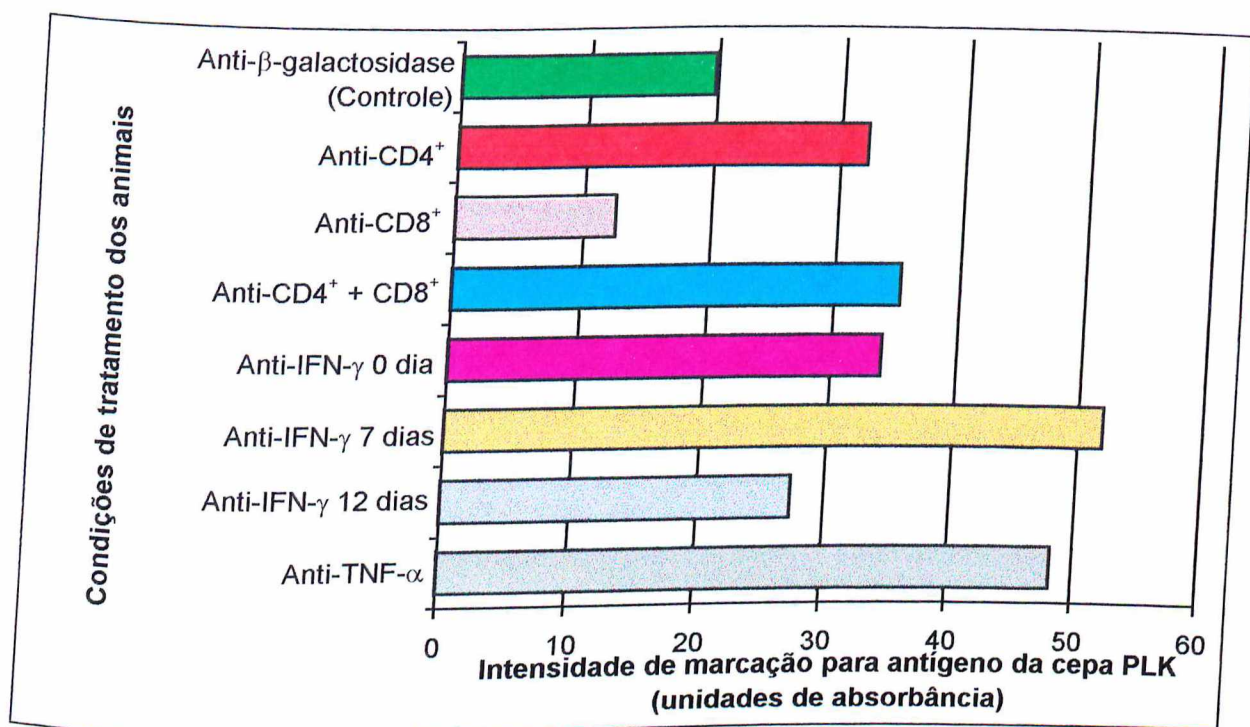


Figura 56- Detecção de antígeno da cepa PLK, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.6.9) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANTÍGENO DA CEPA PTgB NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL DE COELHO ANTI-CEPA PTgB E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Ao nível de microscopia de luz, animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ e animais tratados com anticorpo monoclonal controle, apresentaram poucos parasitas dentro dos cistos cerebrais com coloração castanha (Figuras 57 e 58). Alguns se apresentaram praticamente sem coloração castanha. A análise fotométrica confirma a presença de antígeno da cepa PTgB em cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ou que foram tratados com anticorpo monoclonal controle (Figura 59). Reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa PTgB em cistos cerebrais de animais que sofreram depleções de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal controle, apresentaram intensidade de marcação estatisticamente maior, que reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0451$). Não houve diferença estatística na intensidade de marcação para antígeno da cepa PTgB, entre animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ isoladamente ou T CD4⁺ e T CD8⁺ ou animais tratados com anticorpo monoclonal controle ($p \geq 0,1513$).

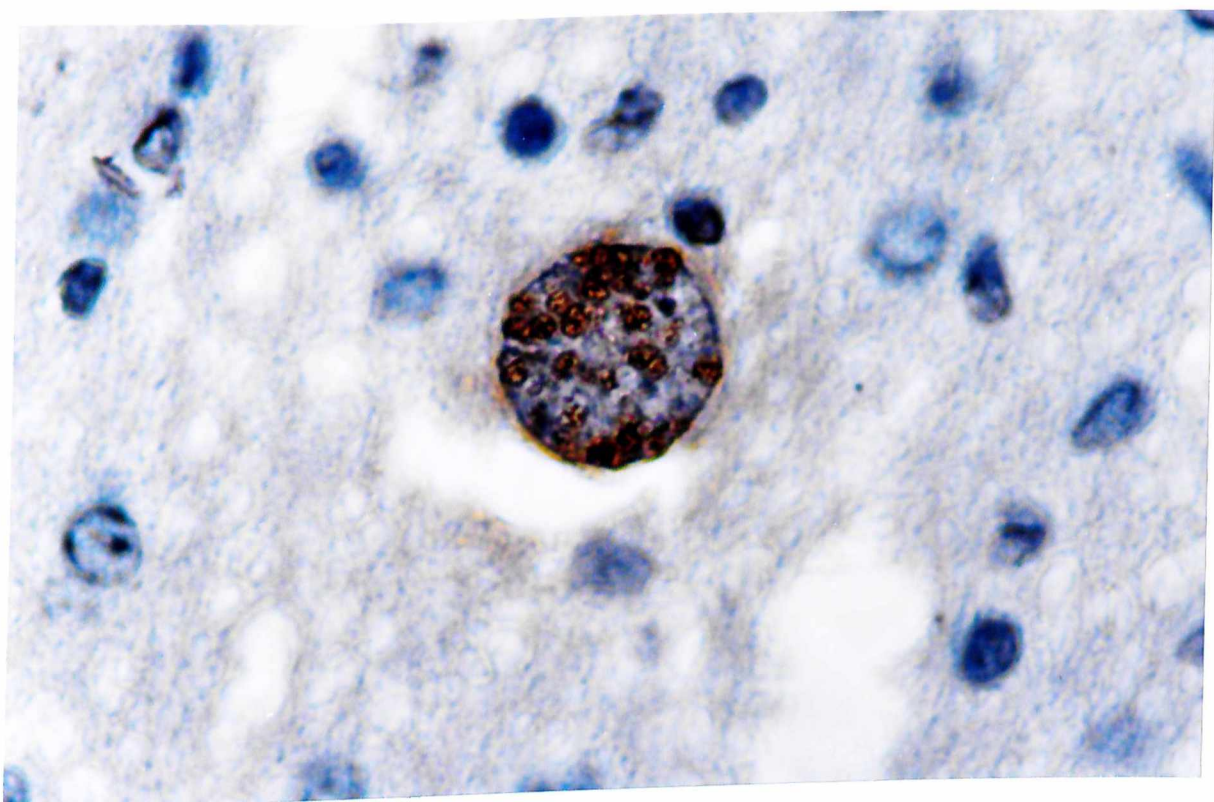


Figura 57 - Expressão de antígeno da cepa PTgB, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD8⁺, 290x.

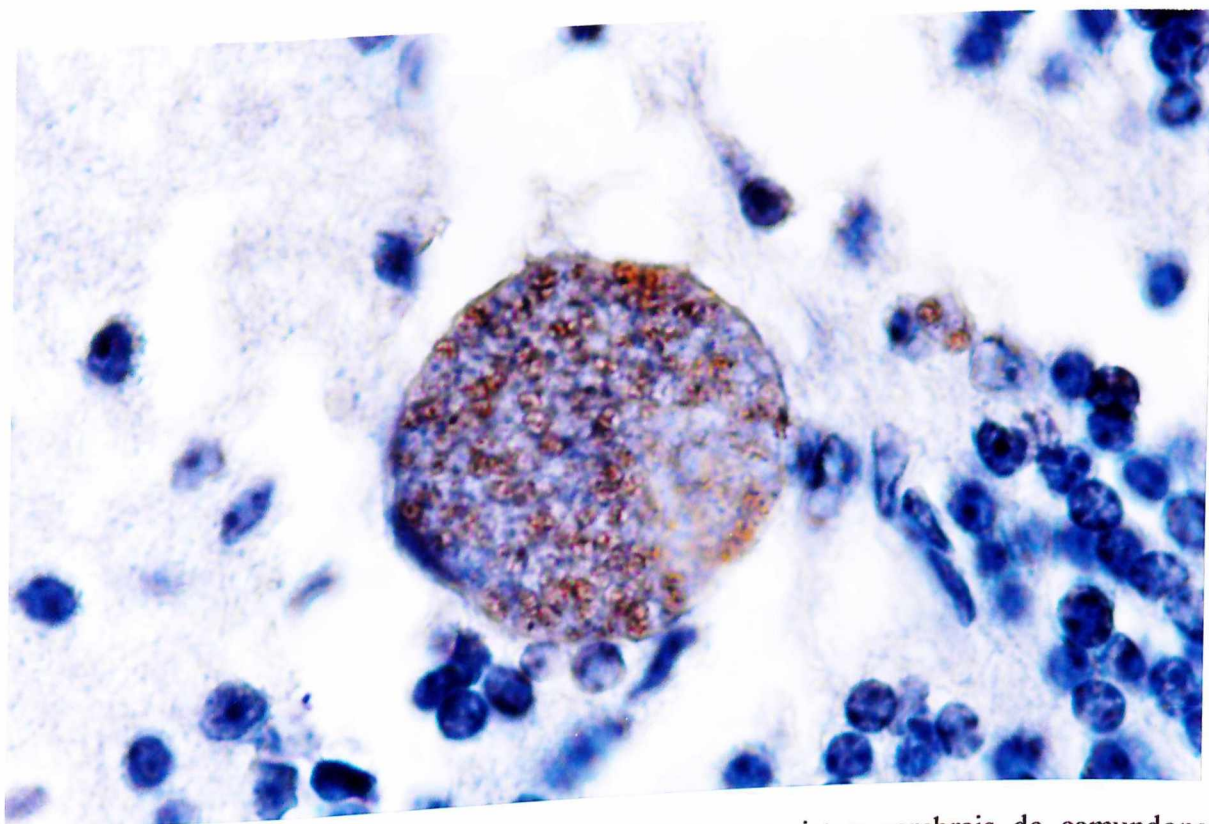
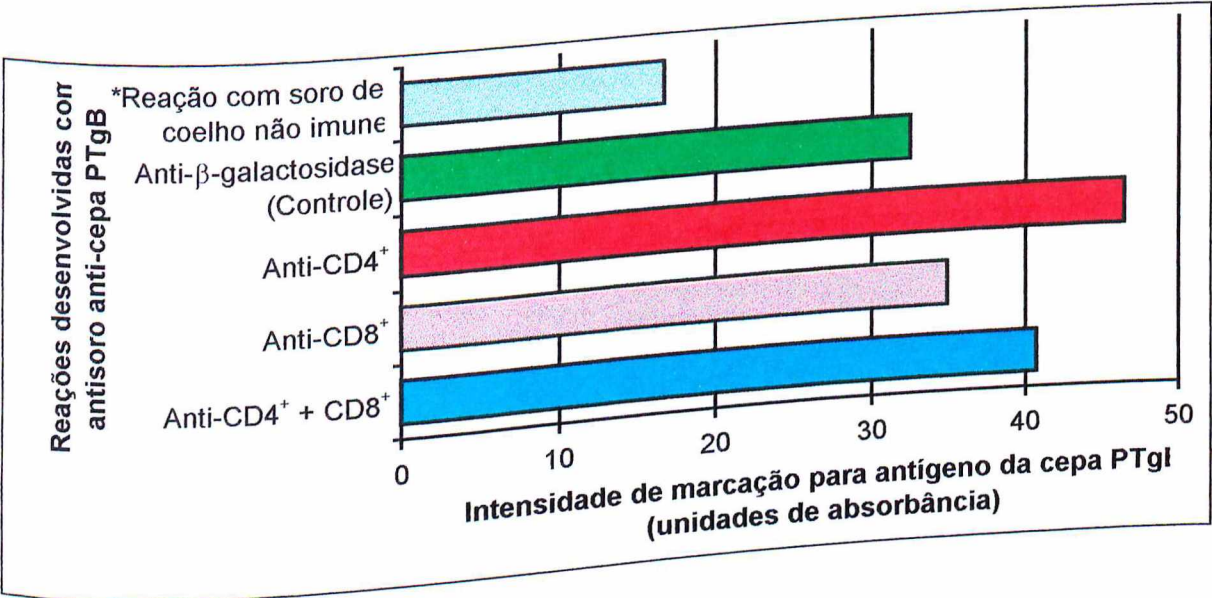


Figura 58 - Expressão de antígeno da cepa PTgB, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, 290x.



* Controle da reação.

Figura 59- Detecção de antígeno da cepa PTgB, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

À microscopia de luz, reações desenvolvidas com antisoro de coelho anti-cepa PTgB em animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α , apresentaram a maioria dos parasitas nos cistos corados (Figura 60). À análise fotométrica, como pode ser observado na Figura 61, animais no dia zero de neutralização, neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 12 dias ou neutralizados de TNF- α , apresentaram coloração semelhante dos parasitas. Reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa PTgB em animais que foram neutralizados de IFN- γ no dia zero, por 7 ou 12 dias ou neutralizados de TNF- α apresentaram uma intensidade de marcação estatisticamente maior que reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0191$). Não foram observadas diferenças na intensidade de marcação para antígeno da cepa PTgB entre animais neutralizados de IFN- γ no dia zero, durante 7 ou 12 dias ou neutralizados de TNF- α ($p \geq 0,0905$).

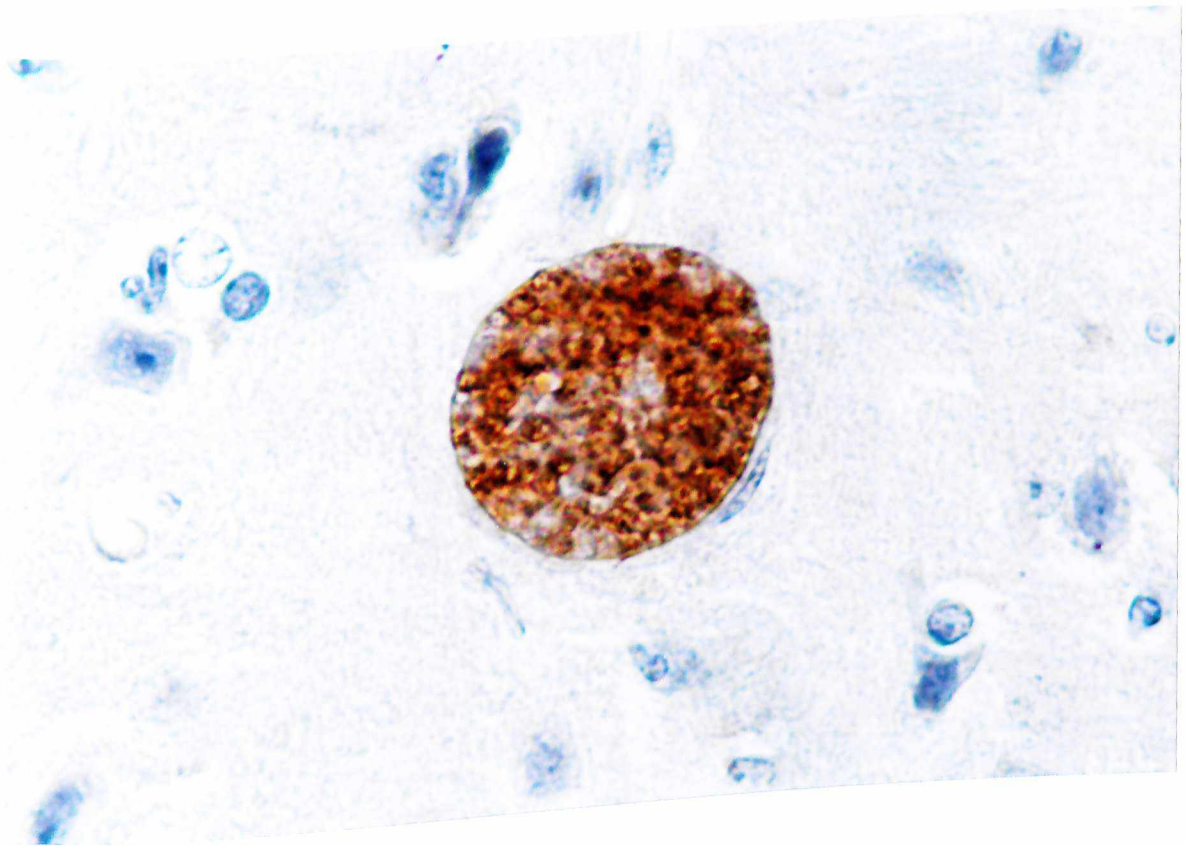
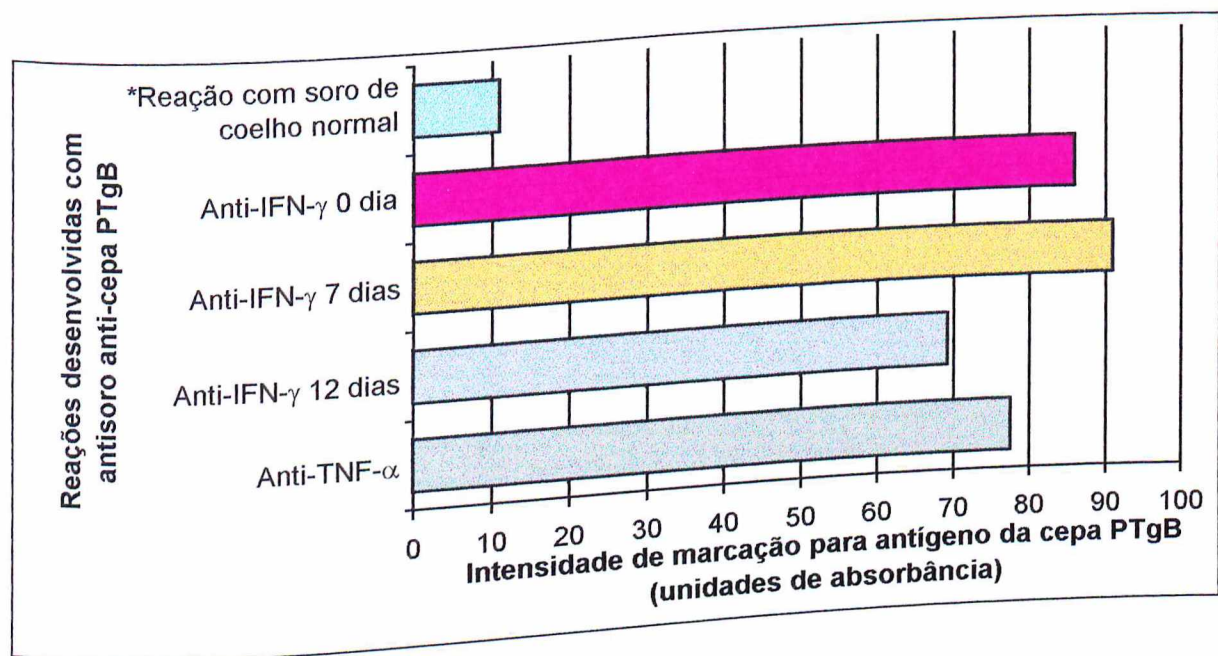


Figura 60 - Expressão de antígeno da cepa PTgB, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de $\text{TNF-}\alpha$, 290x.



* Controle da reação.

Figura 61- Detecção de antígeno da cepa PTgB, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

Como demonstrado na figura 62, animais neutralizados de IFN- γ no dia zero, aos 7 ou 12 dias ou neutralizados de TNF- α apresentaram uma intensidade de marcação para antígeno da cepa PTgB, maior que animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ou que foram tratados com anticorpo monoclonal controle ($p \leq 0,0021$).

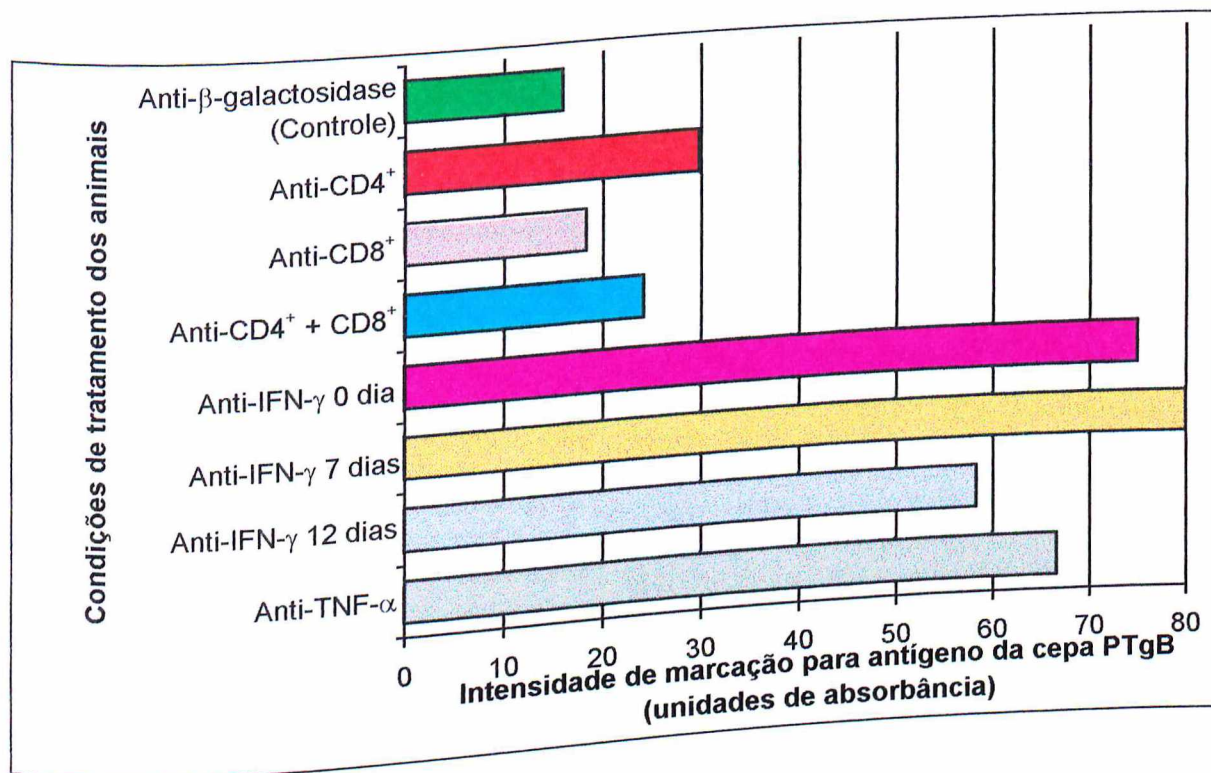


Figura 62- Detecção de antígeno da cepa PTgB, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.6.10) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANTÍGENO DA CEPA CEP NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL DE COELHO ANTI-CEPA CEP E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

À microscopia de luz, cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal controle, apresentaram a grande maioria dos parasitas com coloração castanha, inclusive a parede dos cistos (Figura 63 e 64). Animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ isoladamente ou T CD4⁺ e T CD8⁺, apresentaram uma coloração castanha da maioria dos parasitas dos cistos, mais intensa que animais que sofreram depleção de células T CD8⁺. A fotometria confirmou a presença de antígeno da cepa CEP nos cistos cerebrais dos animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal controle. Reações desenvolvidas com antisoro anti-cepça CEP, apresentaram intensidade de marcação maior que reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0282$) (Figura 65). Cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, apresentaram uma marcação mais intensa para antígeno da cepa CEP, que animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal controle ($p \leq 0,0363$).

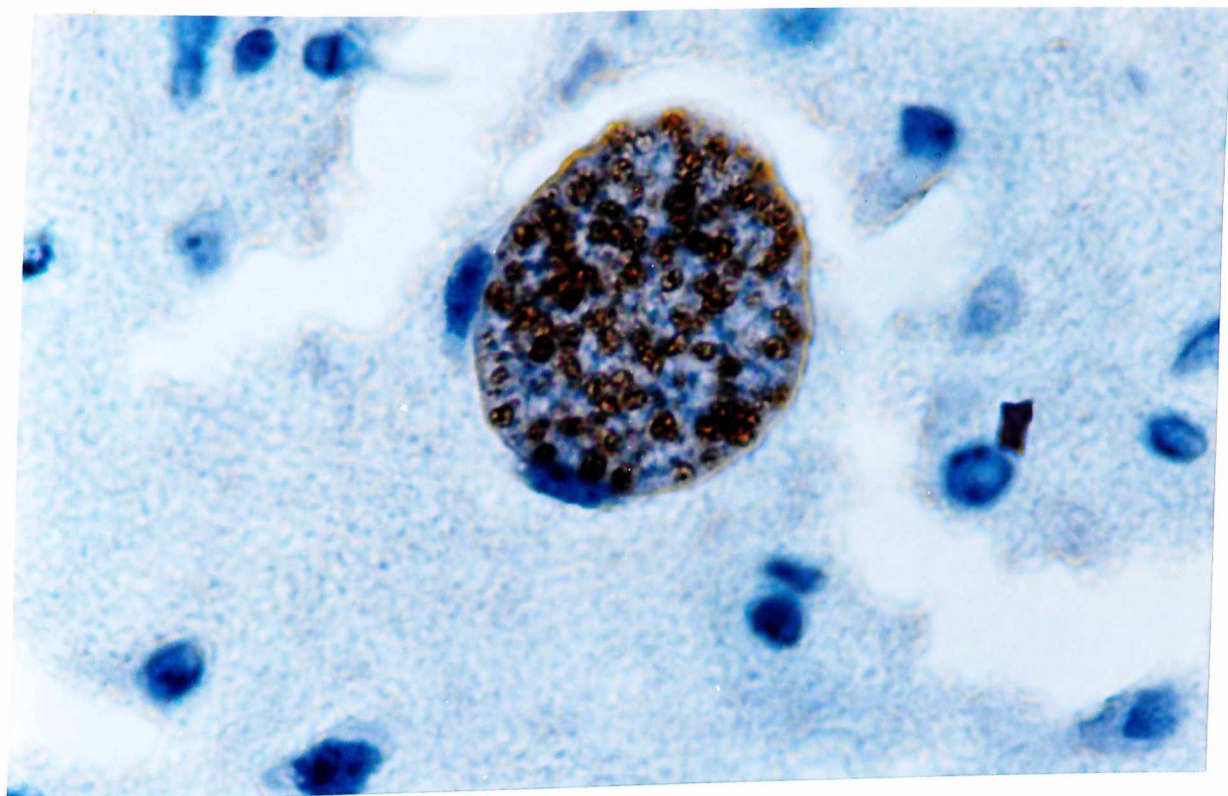


Figura 63 - Expressão de antígeno da cepa CEP, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD8⁺, 290x.

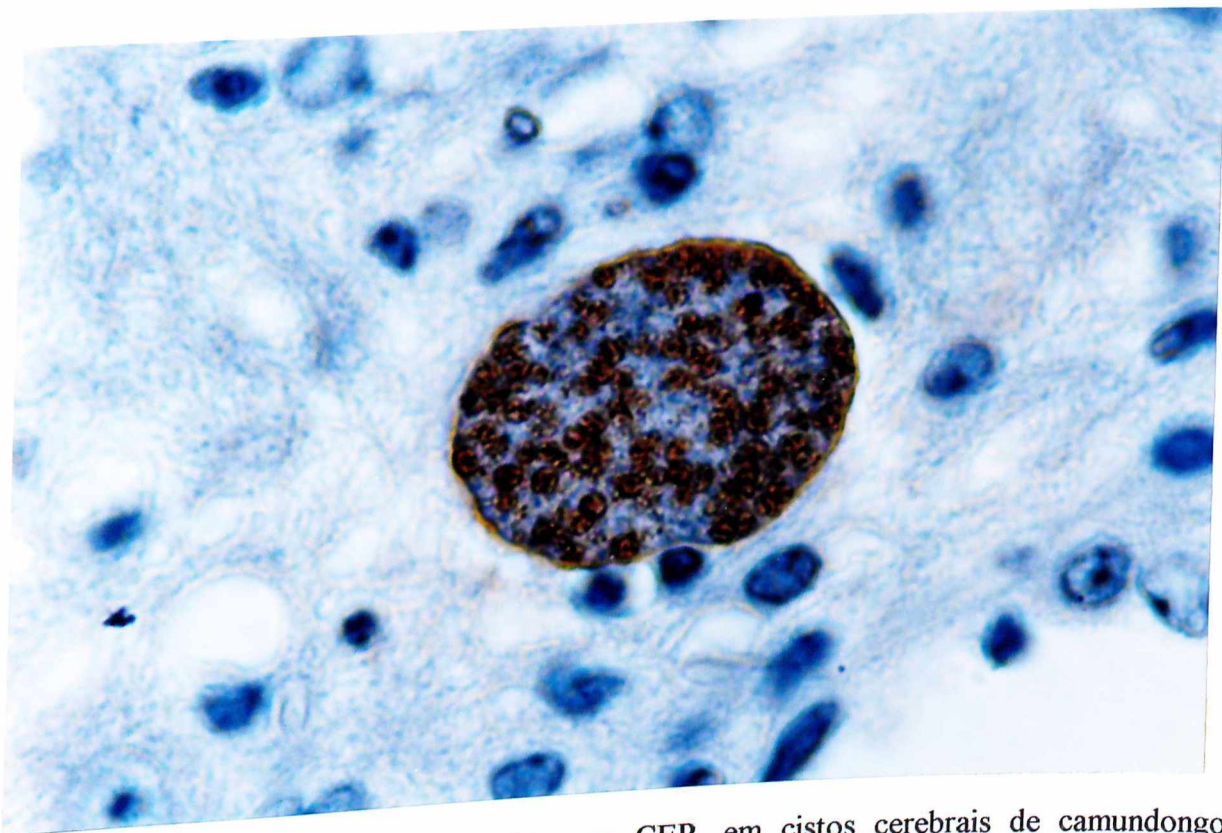


Figura 64 - Expressão de antígeno da cepa CEP, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, 290x.

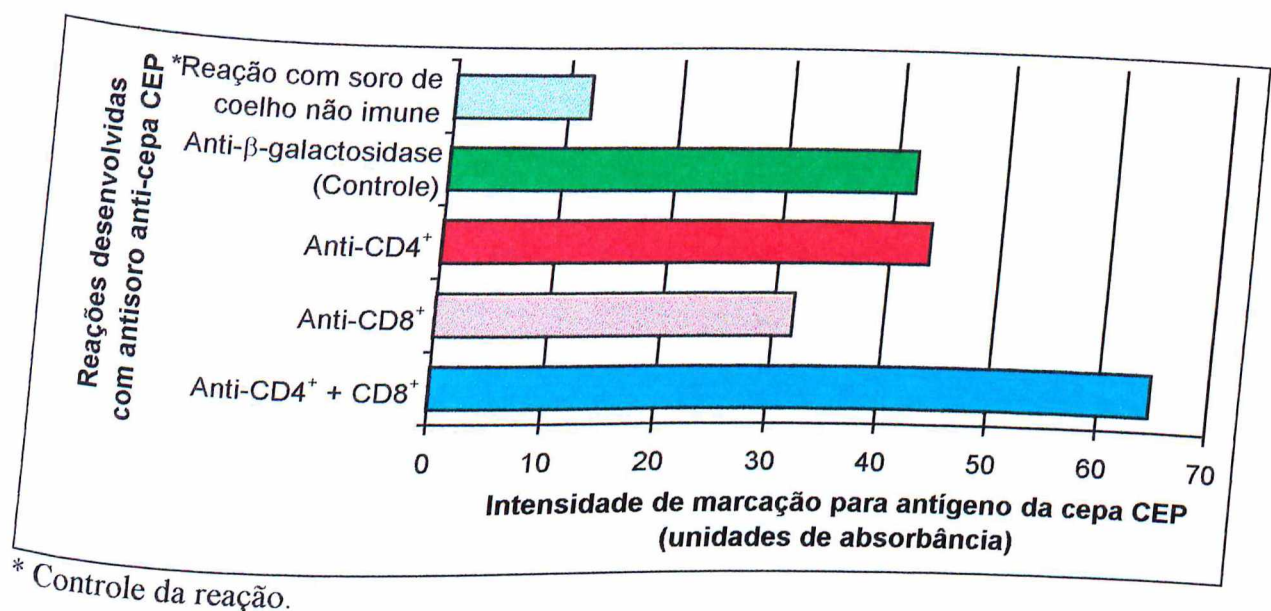


Figura 65- Detecção de antígeno da cepa CEP, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

À microscopia de luz, reações desenvolvidas com antisoro de coelho anti-cepa CEP, em cistos cerebrais de animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α apresentaram a maioria dos parasitas nos cistos corados (Figura 66). Animais no dia zero de neutralização, neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 12 dias ou neutralizados de TNF- α , apresentaram coloração semelhante dos parasitas. À análise fotométrica, reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa CEP em animais que foram neutralizados de IFN- γ no dia zero, por 7 ou 12 dias ou neutralizados de TNF- α apresentaram uma intensidade de marcação estatisticamente maior que reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0023$) (Figura 67). Animais neutralizados de IFN- γ no dia zero, apresentaram cistos marcados mais intensamente para antígeno da cepa CEP, que animais neutralizados durante 12 dias ($p = 0,0151$). Entretanto, não houve diferença na intensidade de marcação entre animais no dia zero de neutralização e animais neutralizados de IFN- γ durante 7 dias ou neutralizados de TNF- α ($p \geq 0,2178$). Cistos de animais neutralizados de TNF- α apresentaram-se mais intensamente marcados que os cistos de animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias ($p = 0,0012$).

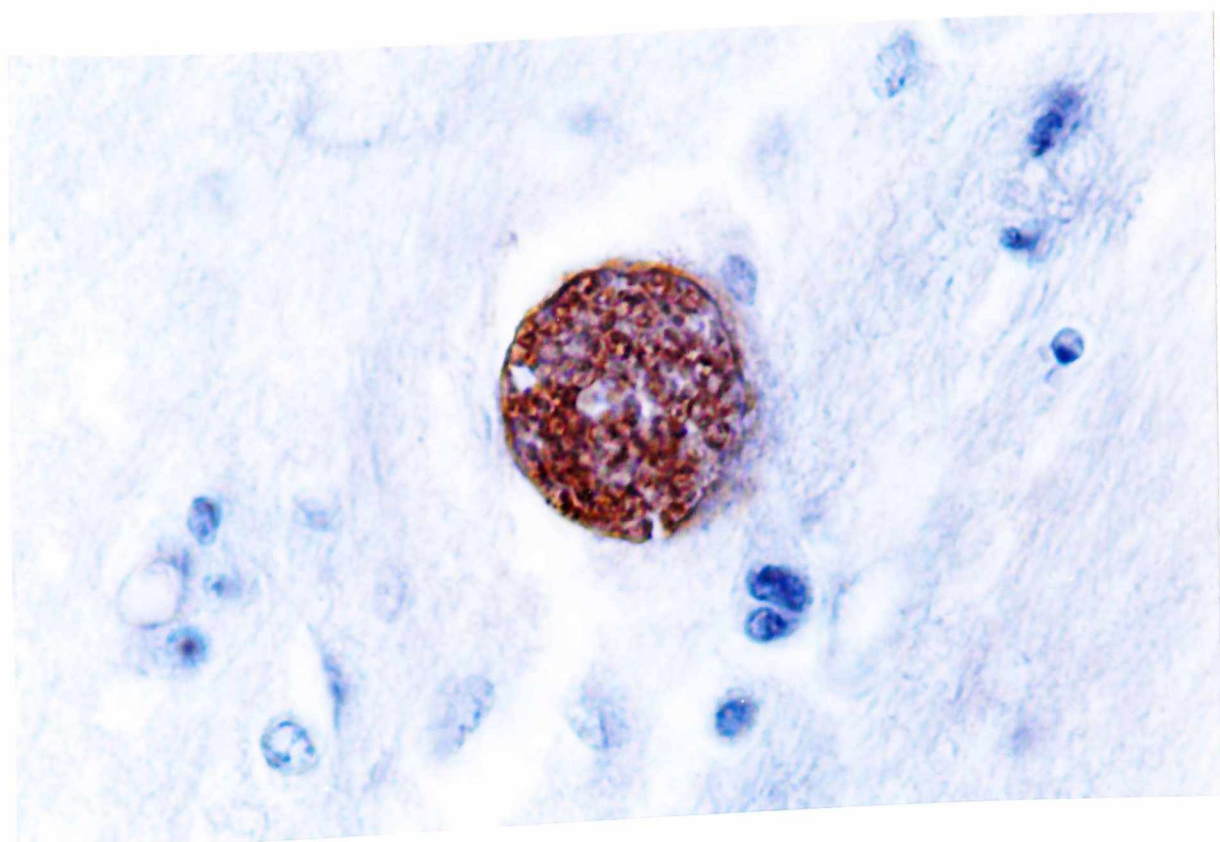
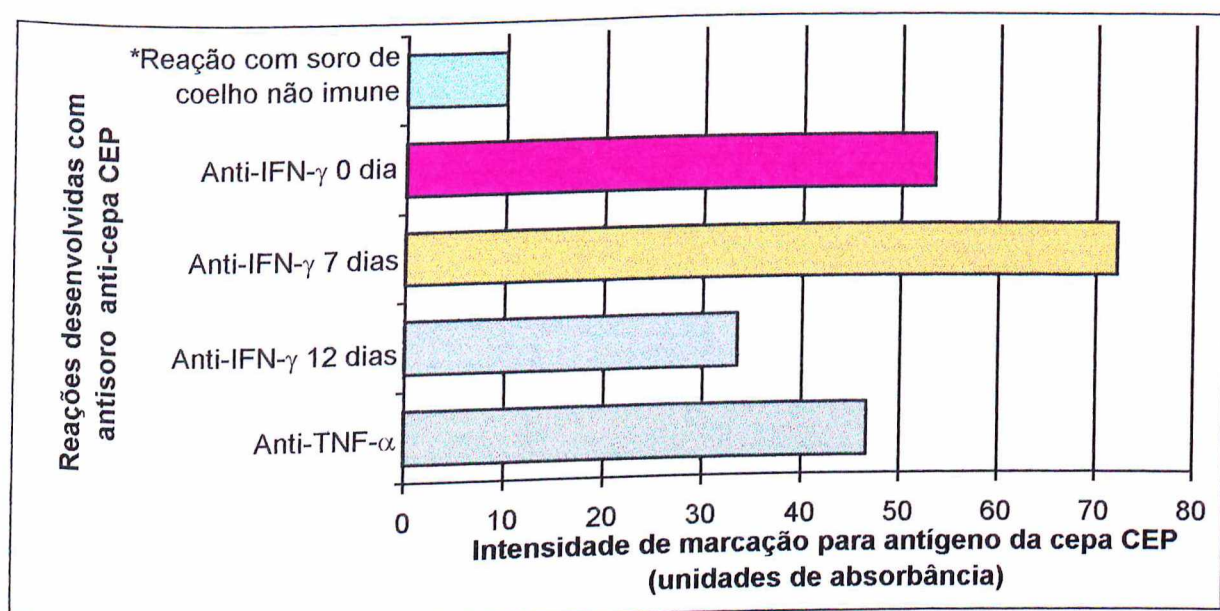


Figura 66 - Expressão de antígeno da cepa CEP, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de $\text{TNF-}\alpha$, 290x.



* Controle da reação.

Figura 67- Detecção de antígeno da cepa CEP, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

Como pode ser observado na Figura 68, cistos de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, apresentaram-se mais intensamente marcados que cistos de animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias ($p = 0,0001$). Entretanto, cistos de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ não apresentaram diferença de marcação, com cistos de animais neutralizados de IFN- γ por 7 dias ou neutralizados de TNF- α ($p \geq 0,570$).

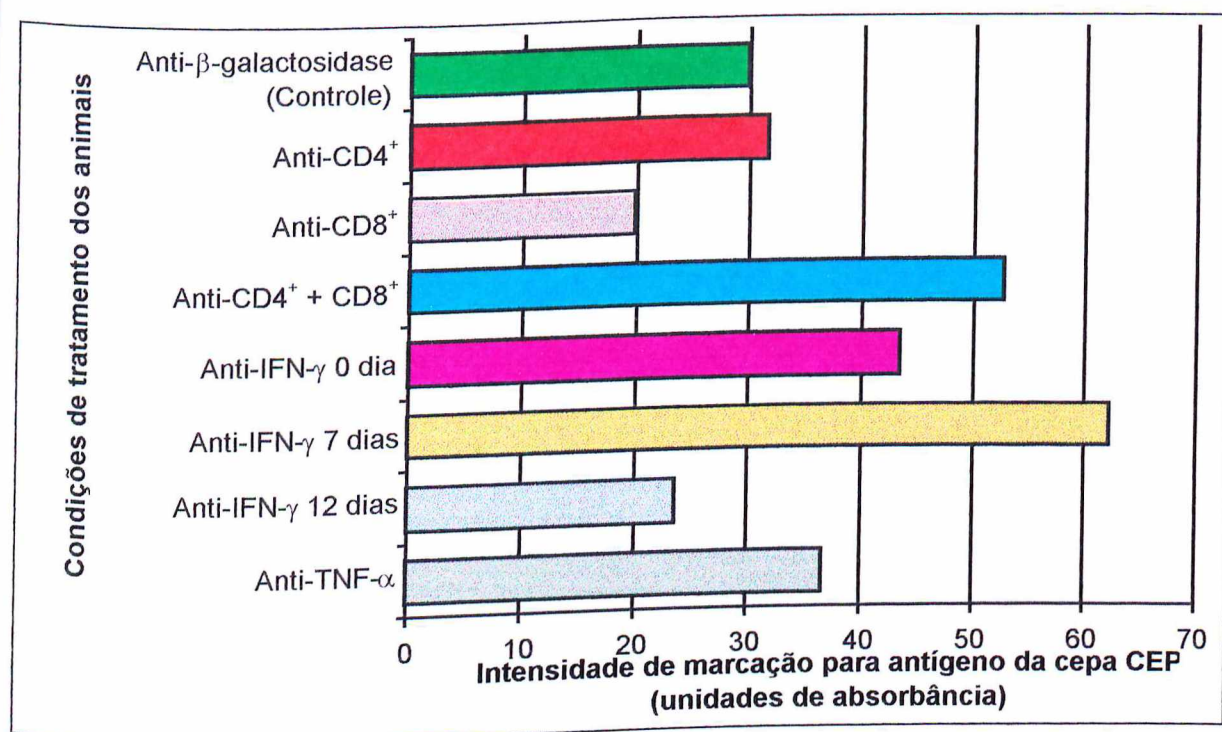


Figura 68- Detecção de antígeno da cepa CEP, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.6.11) RESULTADOS DA ANÁLISE DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ANTÍGENO DO ESTÁGIO DE OOCISTO DE *T. GONDII* NA ÁREA DOS CISTOS CEREBRAIS, UTILIZANDO ANTISORO POLICLONAL DE COELHO ANTI-OOCISTO E CORRELAÇÃO COM O DÉFICIT IMUNOLÓGICO DO ANIMAL

Ao nível de microscopia de luz, alguns parasitas nos cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ou tratados com anticorpo monoclonal controle apresentaram coloração castanha (Figuras 69 e 70), mas esta não foi observada em alguns cistos. À fotometria não houve diferença estatística entre reações desenvolvidas com antisoro anti-oocisto e aquelas desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \geq 0,0932$) (Figura 71). Não foram observadas diferenças entre animais que sofreram diferentes depleções de células T e animais tratados com anticorpo monoclonal controle ($p \geq 0,0909$), como também entre os grupos de depleções de células T ($p \geq 0,0655$).

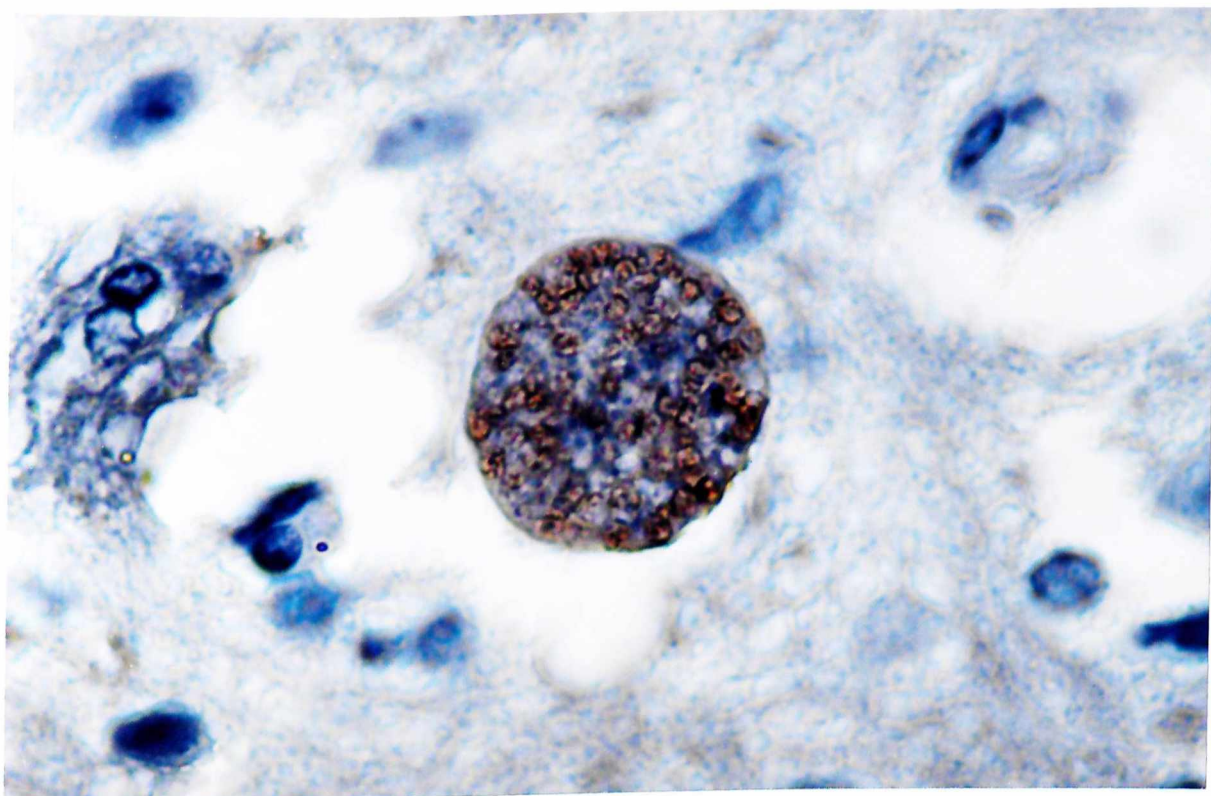


Figura 69 - Expressão de antígeno do estágio de oocisto, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD8⁺, 290x.

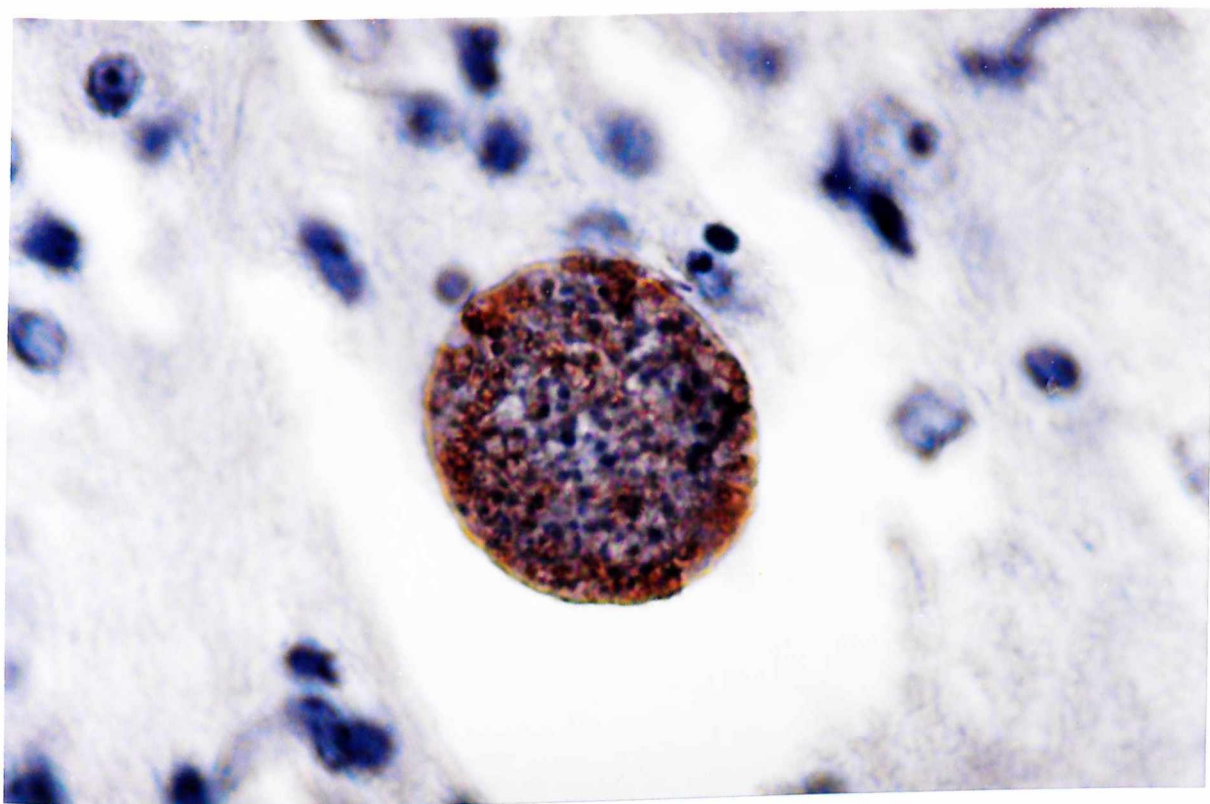
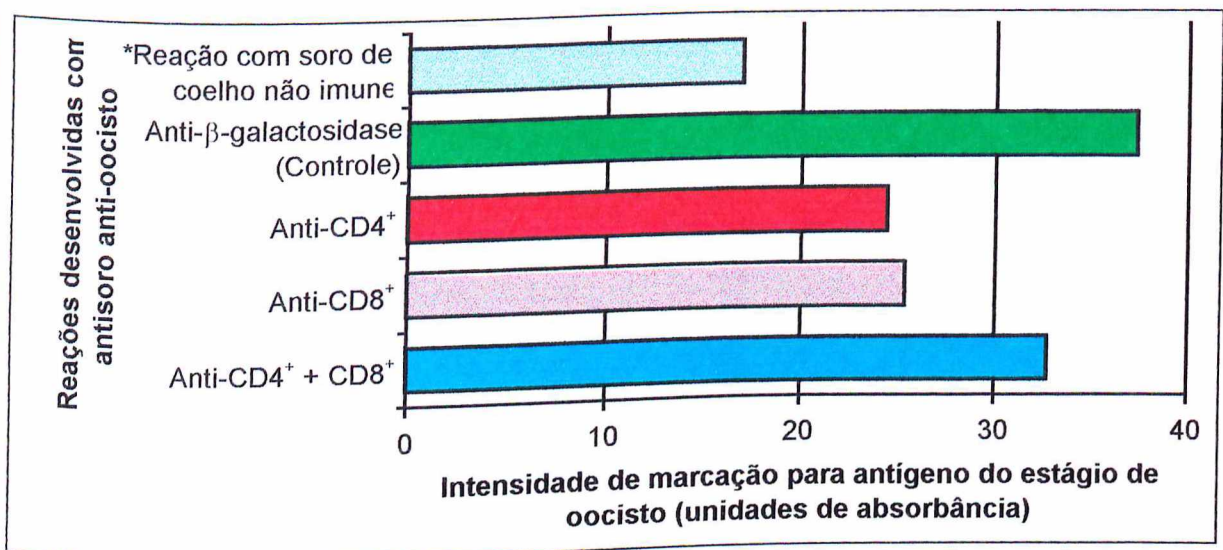


Figura 70 - Expressão de antígeno do estágio de oocisto, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, 290x.



* Controle da reação.

Figura 71- Detecção de antígeno do estágio de oocisto, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o grau de imunossupressão do animal por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

Animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α , apresentaram à microscopia de luz, alguns parasitas com coloração castanha. Também foram observados alguns cistos com ausência de parasitas corados e outros com coloração da maioria dos parasitas (Figura 72). A análise computadorizada confirmou a marcação para antígeno de oocisto em cistos cerebrais de animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias ou neutralizados de TNF- α (Figura 73). Reações desenvolvidas com antisoro anti-oocisto apresentaram uma intensidade de marcação maior que reações desenvolvidas com soro de coelho não imune ($p \leq 0,0004$). Animais que sofreram neutralização de TNF- α apresentaram intensidade de marcação para antígeno de oocisto nos cistos cerebrais, maior que animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias ($p < 0,0001$).

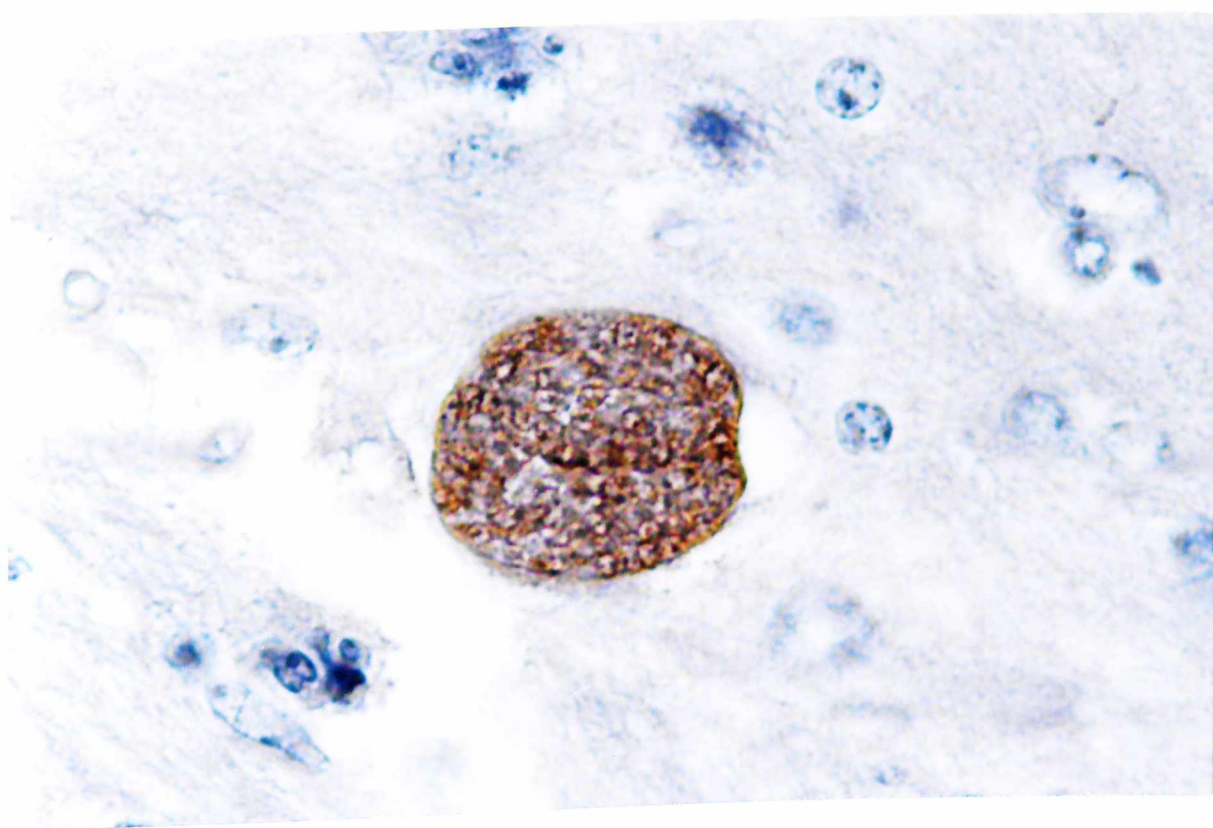
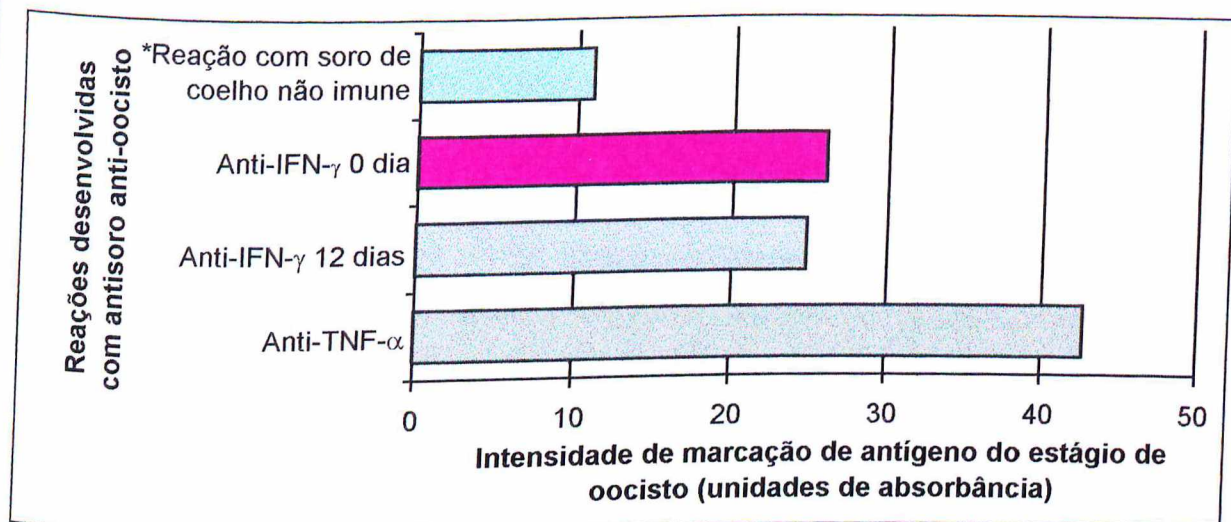


Figura 72 - Expressão de antígeno do estágio de oocisto, em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e que sofreram neutralização de $\text{TNF-}\alpha$, 290x.



* Controle da reação.

Figura 73- Detecção de antígeno do estágio de oocisto, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal.

A Figura 74 mostra que não houve diferença na intensidade de marcação para antígeno de oocisto, em cistos cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, com animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias ($p = 0,2982$). Entretanto, animais neutralizados de TNF- α apresentaram os cistos cerebrais marcados mais intensamente que animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ ($p = 0,0058$).

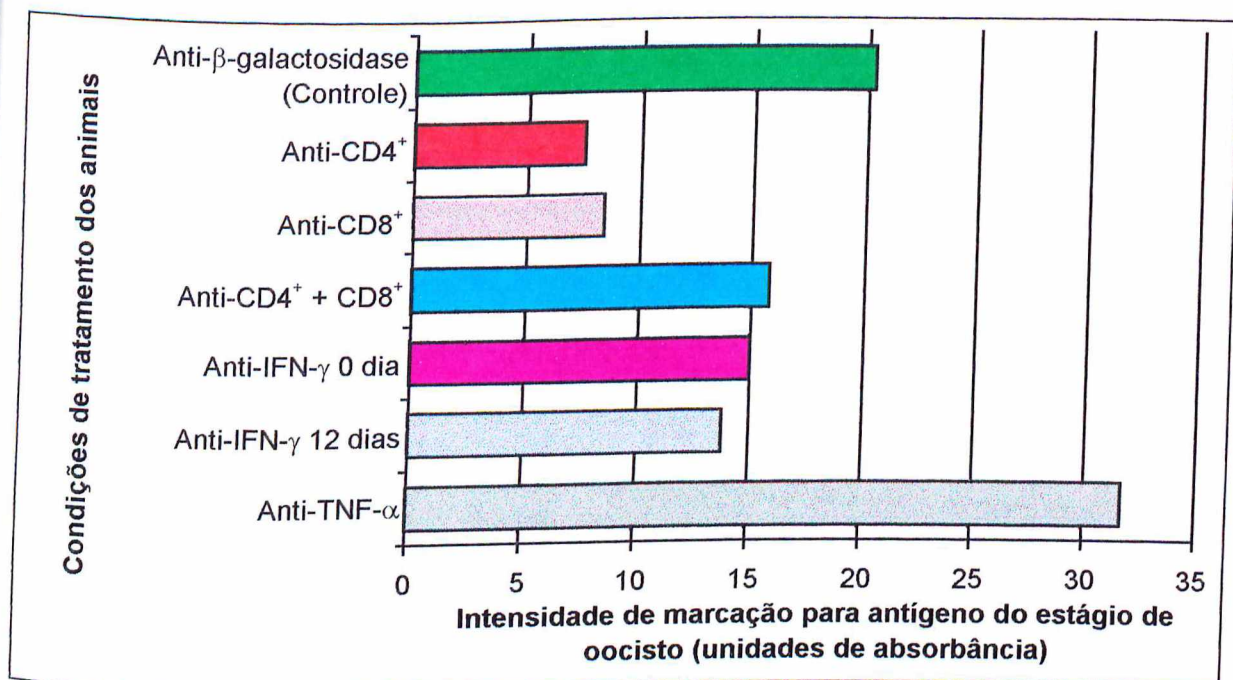


Figura 74- Detecção de antígeno do estágio de oocisto, por análise fotométrica em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e correlação com o déficit imunológico do animal. Os valores obtidos à fotometria de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune. Os valores obtidos à fotometria de animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α foram subtraídos dos respectivos valores obtidos com soro não imune.

4.7) DETECÇÃO DE PROTEÍNA DE “STRESS” DE 70 kDa EM *T. gondii* ATRAVÉS DE ANÁLISE POR “WESTERN BLOT”

Por análise “Western blot”, utilizando antisoro anti-Hsp70, observou-se uma leve reatividade com um antígeno de peso molecular de 70 kDa, em antígeno solubilizado em detergente aniônico NP-40 da cepa RH de *T. gondii* (Figura 75, pista 2). Quando se utilizou soro de coelho não imune contra este antígeno, a reatividade não foi observada (dados não mostrados). O soro de coelho não imune foi utilizado também contra a proteína Hsp70, não sendo observada nenhuma reatividade (Figura 75, pista 3). Um novo experimento foi realizado utilizando antígeno liofilizado de taquizoíta da cepa ME-49 de *T. gondii*, o antígeno de peso molecular de 70 kDa não foi observado (dados não mostrados).

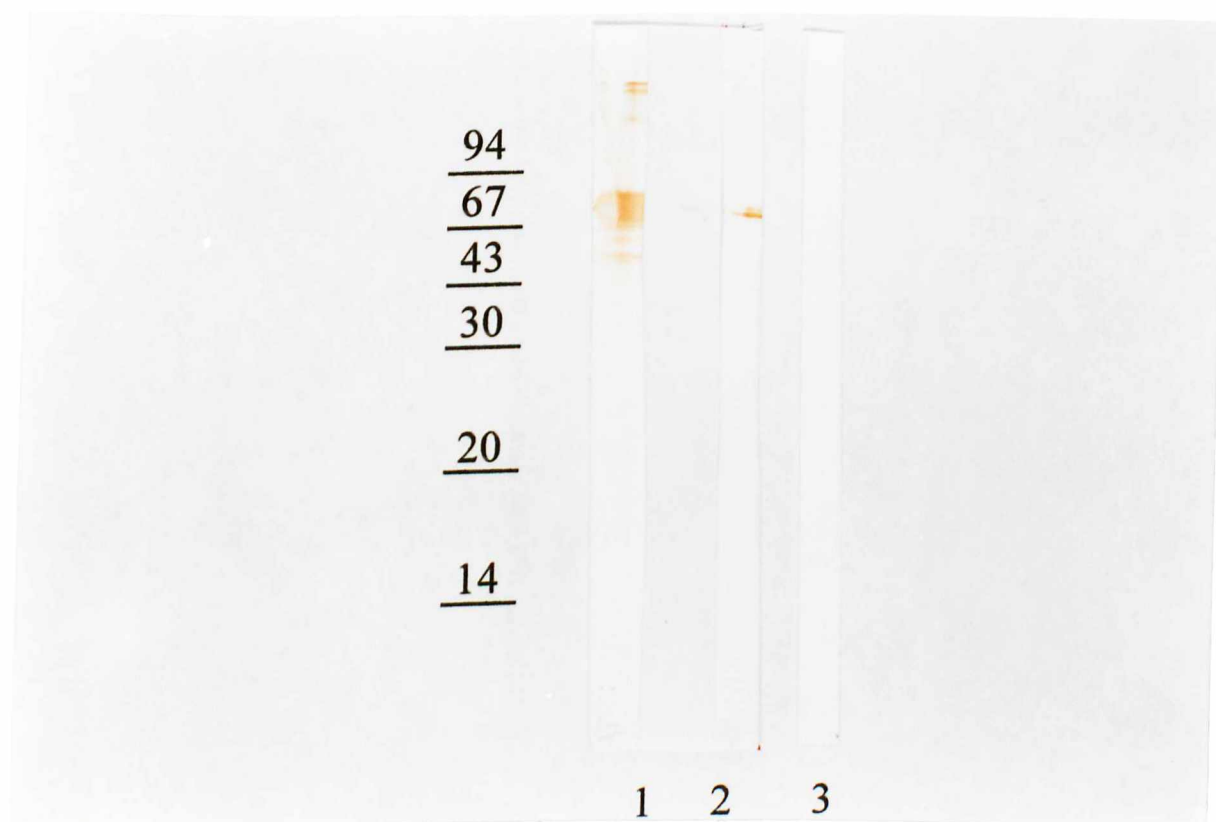


Figura 75- Análise por “Western blot”, SDS-PAGE 14%, para pesquisa de proteína de “stress” de 70 kDa em antígeno solubilizado em detergente aniônico NP-40 da cepa-RH de *T. gondii*, utilizando como anticorpo específico antisoro de coelho contra a porção carboxi-terminal da proteína Hsp70. Pista 1: proteína Hsp70; Pista 2: antígeno de *T. gondii*; Pista 3: proteína Hsp70, utilizando soro de coelho não imune.

Discussão

5) DISCUSSÃO

A incidência de encefalite toxoplásmica tem aumentado com o crescente número de pacientes com imunodeficiências, devido à reativação de infecção latente. Isto torna evidente o importante papel da resposta imune na proteção do hospedeiro (Hunter & Remington, 1994).

A resposta imune mediada por células ao *T. gondii*, representa o principal componente da imunidade a este organismo (Beaman *et al.*, 1992). Macrófagos ativados e linfócitos T (especialmente, T CD8⁺), são as principais células envolvidas neste mecanismo (Khan *et al.*, 1991; Nagasawa *et al.*, 1991; Subauste *et al.*, 1991; Kasper *et al.*, 1992; Denkers *et al.*, 1993b; Shirahata *et al.*, 1994). Células T CD4⁺ e T CD8⁺ atuam aditivamente ou sinergisticamente para prevenir reativação de infecção crônica, provavelmente através da produção de IFN- γ e esta, juntamente com TNF- α , atuam em macrófagos ou células microgлияis, estimulando sua atividade microbicida através da indução da sintase do óxido nítrico (Gazzinelli *et al.*, 1992).

A reativação da infecção se dá pela interconversão de bradizoítas encistados em taquizoítas, um mecanismo que recentemente tem sido bastante estudado (Gross & Bohne, 1994). Os fatores envolvidos na interconversão, fatores do parasita ou da célula hospedeira, não são claros. Após a liberação de taquizoítas, estes promovem o aparecimento de grandes áreas necróticas, marcado infiltrado inflamatório e elevada mortalidade (Gazzinelli *et al.*, 1993).

O presente estudo foi proposto, com os objetivos de se entender melhor os fatores do parasita e do hospedeiro na interconversão de estágio, como também o efeito da imunossupressão no número de taquizoítas e número e tamanho de cistos. Teve também como objetivo, verificar a presença de antígenos compartilhados entre cepas diferentes de *T. gondii*.

A reação de imunocitoquímica foi a ferramenta utilizada para se alcançar as proposições. Para maior clareza, discutiremos separadamente os itens propostos.

5.1) REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA

Reações de imunocitoquímica compreendem um conjunto de técnicas que utilizam anticorpos específicos para um antígeno, para localizá-lo em uma célula ou tecido (Gosselin *et al.*, 1986). Neste estudo, esta reação foi utilizada para localização de antígeno de *T. gondii* em tecidos de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49. Em tais reações, o método indireto que consiste em usar um anticorpo primário contra o antígeno específico e um anticorpo secundário direcionado contra o anticorpo primário (Gosselin *et al.*, 1986), foi adotado devido a sua maior sensibilidade.

Reações ELISA foram desenvolvidas, para definir o melhor título do anticorpo primário a ser utilizado nas reações de imunocitoquímica. Como a maioria dos antisoros primários utilizados foram produzidos em coelhos, definiu-se que a padronização da reação de imunocitoquímica utilizaria o antisoro de coelho anti-cepa RH, devido ao seu alto título.

Reações piloto foram realizadas durante a padronização. Reações desenvolvidas com antisoro secundário marcado com peroxidase não apresentaram resultados específicos e ainda marcaram o tecido inespecificamente, sendo então abandonada.

Outras reações foram desenvolvidas, utilizando-se além do método indireto, amplificação com o kit ABC. De acordo com dados da literatura, reações utilizando amplificação para detecção de antígeno de *Toxoplasma*, fornecem bons resultados, como os observado por Gazzinelli *et al.* (1992), que utilizaram "streptoavidin-peroxidase" para amplificação da reação. O kit ABC é constituído por avidina-biotina-peroxidase. A proteína avidina contém 4 sítios de ligação para a vitamina biotina e, conjugada à biotina, está a enzima

peroxidase; a avidina neste complexo conserva um sítio de ligação para a biotina proveniente do anticorpo secundário. Neste processo, várias moléculas de peroxidase são retidas no sítio antigênico (Rose *et al.*, 1992), aumentando a sensibilidade da reação.

Apesar da amplificação com o complexo avidina-biotina-peroxidase, a reação não foi satisfatória. Embora alguns antígenos sejam permanentemente destruídos por fixação de tecidos com formalina, muitos permanecem preservados. Eles podem, entretanto, estarem mascarados, provavelmente por causa de ligações cruzadas com proteínas ao redor do sítio antigênico (Fox *et al.*, 1985).

Numerosos antígenos podem ser resgatados por digestão com proteases, sendo a tripsina bastante utilizada (Battifora & Kopinski, 1986). Reação com resgate antigênico por tripsina 0,1% foi desenvolvida, observando-se que, apesar do aparecimento de coloração castanha específica dos cistos, ainda prevalecia uma pequena reação tecidual inespecífica.

Diferentes antígenos podem ser recuperados por diferentes métodos. No presente trabalho utilizou-se também como método de resgate antigênico, o forno microondas. A energia do microondas consiste de ondas eletromagnéticas de alta frequência e não ionizantes. Moléculas dipolares como a água oscilam de 2 a 5 bilhões de ciclos por segundo em campo de microondas, produzindo um aquecimento uniforme e instantâneo. Provavelmente este tipo de calor atue dissociando as ligações formadas entre a formalina e proteínas, revelando sítios antigênicos (Sharma *et al.*, 1990). Esta técnica para detecção de antígeno de *Toxoplasma* apresentou resultados satisfatórios neste experimento, como os obtidos anteriormente por Roberts *et al.* (1996). Foi possível a discriminação dos parasitas dentro dos cistos teciduais.

5.2) PRESENÇA DE TAQUIZOÍTAS LIVRES NO TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII*

Em encefalite toxoplásmica, taquizoítas livres são abundantes em áreas necróticas ou próximas a elas. Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, que sofrem depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, apresentam numerosos taquizoítas livres no tecido cerebral (Gazzinelli *et al.*, 1992). Neste estudo, entretanto, utilizando-se o mesmo modelo experimental, observou-se que animais que sofreram ou não depleção de células T CD4⁺ ou T CD4⁺ e T CD8⁺, apresentaram raros taquizoítas livres no tecido. O agravamento da imunossupressão com a depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ não aumentou o aparecimento de taquizoítas livres. Taquizoítas livres não foram detectados em seções cerebrais de animais que sofreram depleção de células T CD8⁺. Este fato não exclui a presença de taquizoítas livres, pois nem todo tecido cerebral foi examinado.

Experimentos de neutralização de IFN- γ e TNF- α (Gazzinelli *et al.*, 1993; Gazzinelli *et al.*, 1994b) demonstram que camundongos C57BL/6 cronicamente infectados, apresentam taquizoítas livres no tecido cerebral. Os taquizoítas livres gradualmente aumentam neste tecido, do 5º ao 9º dia de neutralização de IFN- γ .

Como pôde ser notado, taquizoítas livres foram encontrados em animais neutralizados de IFN- γ a partir do 5º dia e a presença destes aumentou à medida que se aumentou o tempo de neutralização, culminando com vários focos e um número extremamente elevado destes parasitas em animais neutralizados da citocina durante 12 dias. É provável que o aparecimento de elevado número de taquizoítas livres em tecido cerebral de animais neutralizados de IFN- γ , em comparação a animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, seja devido à rápida ausência da citocina nos primeiros. O efeito imediato da ausência de IFN- γ atuaria

também na diminuição da liberação de $\text{TNF-}\alpha$ de macrófago, exacerbando o aparecimento de taquizoítas livres.

A neutralização de $\text{TNF-}\alpha$, provavelmente seja algo mais branda, pois outros mecanismos da imunidade efetora como linfócito T citotóxico, estariam ainda presentes.

5.3) NÚMERO DE CISTOS NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII*

Um "pseudocisto" pode ser definido como uma estrutura envolvendo um organismo (ou organismos) que estimula a formação de um cisto verdadeiro, mas nunca inclui qualquer produto do organismo contido. Seguinte a entrada em um hospedeiro, o *Toxoplasma* sofre um período temporário de multiplicação rápida. A reprodução contínua, nesta fase, resulta em massas parasíticas que assumem formato esférico grosseiro, devido à persistência da membrana da célula hospedeira, que pode apresentar um estiramento extremo embora a célula ainda conserve um núcleo bem evidente. Um "cisto" é considerado como sendo uma estrutura protetora, resistente, formada completa ou parcialmente por substâncias secretadas do organismo contido (Lainson, 1958). Neste estudo o termo "cisto" foi adotado, apesar das estruturas conterem de 4-6 parasitas, pois é evidente, atualmente, que antígenos do parasita são liberados logo após a invasão da célula hospedeira.

Os cistos são formados na fase crônica da infecção, são caracterizados pela formação de uma membrana elástica, forte ao redor dos parasitas, que continuam a se multiplicar lentamente. Os corpos esféricos podem conter de 2-50 *T. gondii* no 8º dia de infecção, a vários milhares em alguns meses (Lainson, 1958).

Com a queda da resistência pela imunossupressão do animal, os bradizoítas se transformam em taquizoítas que são liberados dos cistos. Estes invadem novas células

hospedeiras e começam a se multiplicar, ocasião em que são muito pequenos. Na presente investigação, cistos pequenos contendo a partir de 4 parasitas foram contados.

O número de cistos no tecido cerebral de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ foi maior que aquele de animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ ou que foram tratados com anticorpo monoclonal irrelevante (anti- β -galactosidase), o que está em concordância com experimentos realizados por Gazzinelli *et al.* (1992). A relação entre depleção de células T CD4⁺ e maior número de cistos não são claros, desde que animais que sofrem depleção de células T CD8⁺ são mais susceptíveis à infecção que os primeiros. O agravamento da imunossupressão por depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ promoveu um aumento no número de cistos, mas este não foi significativo em relação aos animais que sofreram depleção de células T CD4⁺.

A neutralização de IFN- γ aumentou o número de cistos no cérebro dos animais e o número foi extremamente elevado aos 12 dias de neutralização. Também foi observado um número elevado de cistos cerebrais em animais que sofreram neutralização de TNF- α . Os resultados mostram que a imunidade promovida pelas citocinas IFN- γ e TNF- α são primordiais para conter o desenvolvimento do parasita e patologia provocada por ele.

É provável que além do grau de imunossupressão do animal, o número elevado de cistos cerebrais esteja também relacionado às características genéticas do animal. Camundongos que apresentam o haplotipo H-2^b (C57BL/6, C57BL/10), desenvolvem encefalite toxoplásmica severa com maior número de cistos cerebrais (Suzuki *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1995) e este fato pode ter contribuído para o elevado número de cistos encontrados nesta investigação.

O número de cistos pode ser influenciado também pela cepa do parasita. O controle genético de resistência contra infecção aguda por *T. gondii* difere dependendo da cepa do parasita (Suzuki *et al.*, 1995). A cepa ME-49 promove a formação de um maior número de

cistos em camundongos CBA/Ca, que aqueles infectados com a cepa DAG (Suzuki *et al.*, 1989a). É possível que em adição às características genéticas do animal, a cepa do parasita tenha também influenciado no grande número de cistos encontrados.

5.4) ÁREA E DIÂMETRO DOS CISTOS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII*

Segundo (Lainson, 1958), o diâmetro do cisto pode ser tão pequeno, de maneira que contenha 2 a 4 parasitas ou pode ser grande o suficiente para conter milhares de parasitas, sendo que os cistos podem medir de 12 a 14 micrômetros quando contêm de 2 a 6 parasitas (Hutchison *et al.*, 1968). Neste experimento, cistos contendo 4 parasitas ou mais foram analisados quanto à área e diâmetro.

Camundongos da linhagem STR infectados com a cepa de baixa virulência SRRA de *T. gondii* apresentam cistos cerebrais de tamanho variado dependendo do tempo de infecção. Aos 11 dias eles medem de 7-12 μ m, 10-20 μ m aos 28 dias, 15-30 μ m aos 3 meses e 30-50 μ m quando têm mais que um ano (Ferguson & Hutchison, 1987a,b). Entretanto, verificou-se na presente investigação que os cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* durante 50 dias (animais tratados com anticorpo monoclonal anti- β -galactosidase) apresentaram cistos cerebrais com diâmetro médio de 45,4 μ m. É provável que esta diferença em tamanho relacionada ao tempo de infecção, seja devido a cepa do parasita ou a linhagem do camundongo estudada. Convém reforçar que camundongos C57BL/6 são animais altamente susceptíveis à infecção por *Toxoplasma*, podendo facilitar o desenvolvimento de cistos e podendo estes serem maiores.

Neste estudo, observou-se que o tamanho dos cistos variou de 88 μm a 11,5 μm .

A diferença de tamanho, fornecida pela área e diâmetro dos cistos cerebrais dos animais que sofreram depleção de células T CD4^+ e/ou T CD8^+ ou tratados com anticorpo monoclonal anti- β -galactosidase foi pequena. Segundo Suzuki *et al.* (1989b) camundongos CBA/Ca infectados com a cepa ME-49 e neutralizados de IFN- γ apresentam muitos pequenos cistos no cérebro quando comparados com animais controle. Em nosso experimento animais neutralizados de IFN- γ a partir dos 7 dias, ou que foram neutralizados de TNF- α , apresentaram área e diâmetro dos cistos cerebrais menores que dos animais que sofreram depleção de células T CD4^+ e/ou T CD8^+ . O grau de imunossupressão promovido pela neutralização de IFN- γ ou TNF- α apresentou-se mais grave que aquele promovido pela depleção de células T CD4^+ e/ou T CD8^+ . Com a neutralização das citocinas, os efeitos de sua ausência são imediatos, enquanto que a depleção de células T leva a uma diminuição das citocinas a longo prazo. IFN- γ é um importante mediador de resistência ao *T. gondii* (Suzuki *et al.*, 1988) e juntamente com TNF- α (Gazzinelli *et al.*, 1993), participa na imunidade protetora ao parasita.

O menor tamanho dos cistos observados com o agravamento da imunossupressão dos animais, provavelmente esteja relacionado com a ruptura destes, liberação de taquizoítas e reinfecção de novas células.

5.5) EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE TAQUIZOÍTAS NOS CISTOS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII*

A expressão dos antígenos P30 (SAG-1) e P22 (SAG-2) foi observada em animais tratados com anticorpo monoclonal controle (anti- β -galactosidase). Os antígenos P30 e P22 são específicos do estágio de taquizoíta (Couvreur *et al.*, 1988; Parmley *et al.*, 1994), sendo P30 o principal antígeno de superfície deste estágio (Kasper *et al.*, 1983). Segundo Woodison & Smith (1990), o antígeno principal de superfície de taquizoíta (P30) não foi detectado em cistos cerebrais de camundongos cronicamente infectados com as cepas Gleadle, 17025 ou 18691 do parasita. Como verificado no presente estudo, os cistos cerebrais apresentaram além de bradizoítas, normalmente encontrados em tais estruturas, taquizoítas, que são as formas do parasita geralmente encontradas na fase aguda da infecção.

Ferguson *et al.* (1994), comparando a morfologia de cistos cerebrais de camundongos infectados com diferentes cepas de *T. gondii*, observaram que cistos da cepa ME-49 apresentam diferentes proporções de bradizoítas em divisão e alguns imaturos, enquanto que os de outras cepas apresentam somente bradizoítas maduros. Concluíram que a cepa ME-49 pode provocar uma infecção crônica instável, com um "turnover" contínuo dos parasitas.

Cistos não são estruturas temporárias e servem para preservar a viabilidade de *T. gondii* por longos períodos (Lainson, 1958). Entretanto, bradizoítas da cepa ME-49 contidos em cistos cerebrais de camundongos, podem ter um ciclo de vida muito mais curto do que se imagina (Pavesio *et al.*, 1992). A detecção de antígenos nos cistos cerebrais, que somente são encontrados em taquizoítas, como observado neste trabalho, suplementa dados da literatura comprovando que os cistos da cepa ME-49 são bastante instáveis. Dentro destes cistos podem ser encontrados além dos bradizoítas, os taquizoítas. Apesar dos experimentos desenvolvidos

por Pavesio *et al.* (1992) terem utilizado camundongos "Swiss Webster", que são mais resistentes, novos estudos são necessários para se detectar a presença de antígeno de taquizoíta em cistos cerebrais de camundongos resistentes infectados com tal cepa.

Em alguns cistos dos animais tratados com anticorpo monoclonal controle, os antígenos P30 e P22 não foram detectados por reação de imunocitoquímica, à microscopia de luz. À análise fotométrica geral de tais animais, a marcação para os antígenos P30 e P22 não foi significativa. Durante a execução da análise fotométrica, não é possível discriminar entre cistos marcados e não marcados, como pode ser feito à microscopia de luz, provavelmente cistos sem marcação, foram também analisados, diminuindo os valores numéricos de intensidade de marcação.

Da mesma forma, animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ apresentaram também alguns cistos não marcados à microscopia de luz para o antígeno P30, sendo à fotometria considerados com baixa intensidade de marcação, fato este não observado em relação ao antígeno P22, provavelmente porque todos os cistos apresentaram alguma marcação para tal antígeno.

Animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ ou T CD4⁺ e T CD8⁺, apresentaram marcação para antígeno P30 e P22 significativa, mostrando que nestes animais poderia estar ocorrendo um maior grau de interconversão de estágio de bradizoíta para taquizoíta. Estes fatos sugerem que células T CD8⁺ ou a ação conjunta de ambas T CD4⁺ e T CD8⁺, são importantes para conter a interconversão do parasita.

A expressão do antígeno P22 aumentou linearmente, à medida em que se aumentou a imunossupressão por depleção de células T CD8⁺ ou T CD4⁺ e T CD8⁺.

A expressão de antígenos P30 e P22, foi maior em animais que sofreram depleção de células T CD8⁺, quando comparados com animais que sofreram depleção de células T CD4⁺, confirmando dados da literatura que células T CD8⁺ são as principais células efectoras na

imunidade ao *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1991; Khan *et al.* 1991; Nagasawa *et al.*, 1991; Subauste *et al.*, 1991; Gazzinelli *et al.*, 1992; Kasper *et al.*, 1992; Jonhson *et al.*, 1995). Provavelmente, o principal efeito protetor da célula T CD8⁺ seja através da produção de IFN- γ (Denkers *et al.*, 1993b; Shirahata *et al.*, 1994).

Ao nível de microscopia de luz, observou-se que animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α apresentaram coloração homogênea da maioria dos cistos, mostrando que a deficiência dos mecanismos imunoregulatórios induzidos por estas citocinas, propiciou um ambiente favorável para interconversão de estágio do parasita.

À fotometria, a maior presença de antígeno P30 em animais neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 9 dias, que em animais neutralizados durante 12 dias, pode ser reflexo de grande ruptura de cistos e liberação de taquizoítas em animais neutralizados de IFN- γ por 7 ou 9 dias. Apesar do maior número de taquizoítas livres em animais neutralizados de IFN- γ aos 12 dias, o número de cistos extremamente elevado em relação aos animais neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 9 dias, pode ter contribuído para este resultado. Aos 7 a 9 dias de neutralização, pode ter havido um rompimento de grande número de cistos, liberação de taquizoítas (maior expressão de antígeno P30) e reinfecção de novas células, refletindo o número extremamente elevado de cistos aos 12 dias de neutralização. Parasitas encistados expressariam o antígeno P30 em menor intensidade que taquizoítas livres. De maneira semelhante ao antígeno P30, P22 foi também expresso em maior intensidade, nos animais neutralizados de IFN- γ durante 9 dias, quando comparados com os animais neutralizados durante 12 dias.

Na conversão de taquizoíta, fase aguda, para o estágio de cisto, uma principal alteração requerida é a diminuição da multiplicação do parasita e talvez até parada do seu ciclo mitótico (Soête & Dubremetz, 1996). Na conversão de bradizoíta para taquizoíta, que ocorre

na reativação de infecção crônica, o contrário provavelmente esteja acontecendo e gradativamente aumenta-se a expressão de antígeno de taquizoíta.

Embora durante interconversão de taquizoítas em bradizoítas *in vitro*, os parasitas apresentem antígenos específicos de taquizoítas e bradizoítas simultaneamente (Bohne *et al.*, 1993b; Soête *et al.*, 1993), é possível que este padrão de expressão também ocorra *in vivo*, durante interconversão de bradizoítas em taquizoítas. Isto poderia justificar a menor expressão de antígeno de taquizoíta aos 12 dias, onde o número de cistos é maior e em estágio de interconversão, do que aos 7 ou 9 dias, quando verifica-se um número relativamente maior de taquizoítas.

Animais neutralizados de IFN- γ durante 9 dias, apresentaram a maior marcação para antígeno de taquizoíta que os animais nas outras condições de tratamento.

Pelas análises fotométricas, observou-se também que animais neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 9 dias ou neutralizados de TNF- α , apresentaram maior marcação para antígeno P30 que animais que sofreram depleção de células T CD4⁺e/ou T CD8⁺. Foi ainda observado que a presença do antígeno P22 foi maior em animais neutralizados de TNF- α , que animais que sofreram depleção de células T CD4⁺e/ou T CD8⁺. A ausência imediata de tais citocinas, provavelmente tenha promovido a interconversão de estágio do parasita.

Diferentemente do observado *in vitro* por Jones *et al.* (1986), onde IFN- γ não promove a interconversão de taquizoítas em bradizoítas, a ausência de IFN- γ ou TNF- α parece facilitar a interconversão de bradizoítas em taquizoítas *in vivo*, ou seja, IFN- γ ou TNF- α poderiam promover a interconversão de taquizoítas em bradizoítas *in vivo*. Estes dados estão em concordância com os estudos de Bohne *et al.* (1993a), que observaram a expressão de antígenos de bradizoítas em macrófagos infectados com taquizoítas e ativados com IFN- γ .

Os mecanismos envolvidos neste fenômeno permanecem obscuros (Weiss *et al.*, 1994), sendo sugerido que a falta de IFN- γ diminua a ativação de macrófagos e produção de óxido nítrico, efeito este também proposto para a citocina TNF- α . O óxido nítrico pode inibir completamente a replicação de taquizoítas (Bohne *et al.*, 1994). É possível que a falta das citocinas, promova a não produção de óxido nítrico, propiciando a replicação do parasita, ruptura cística e liberação de taquizoítas.

Por observações realizadas *in vitro*, o processo de interconversão pode ser estimulado por outros fatores que não os imunológicos, como fatores de estresse do microambiente (Soête *et al.*, 1994). Os taquizoítas sob condições de estresse ambiental, como aumento do pH do meio, iniciam a formação de cistos como uma forma de auto preservação (Soête *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1992). A presença do IFN- γ pode induzir a degradação de triptofano da célula hospedeira e inibir o crescimento de *T. gondii* (Pfefferkorn *et al.*, 1986); esta privação nutricional do parasita poderia dificultar seu ciclo mitótico. A ausência da citocina diminuiria este fator de "stress" facilitando o desenvolvimento do parasita. Se outros fatores do hospedeiro contribuem para a interconversão, ainda não se tem conhecimento.

Experimentos anteriores de interconversão foram realizados *in vitro*. Este é o primeiro estudo de interconversão bradizoíta-taquizoíta *in vivo*. Experimentos *in vitro* utilizando diferentes cepas do parasita mostram que elas diferem entre si na taxa de interconversão taquizoítas-bradizoítas (Gross & Bohne, 1994). Neste estudo, a cepa ME-49 foi utilizada e apresentou uma interconversão pronunciada, à medida que o animal sofreu supressão mais grave de sua resposta imune efetora. Até o momento não se conhece o comportamento de outras cepas do parasita *in vivo* e se em outras linhagens de camundongo, o processo de interconversão seria semelhante.

5.6) EXPRESSÃO DE PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO (HSP70) NOS CISTOS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII*

O uso de um anticorpo específico para a porção mais polimórfica da proteína de "stress" de 70 kDa (Hsp70), nos permitiu detectar a proteína do parasita e não a do hospedeiro, pois segundo Selkirk *et al.* (1989), parece haver uma falta de homologia suficiente entre Hsps do parasita e do hospedeiro. Verificou-se na presente investigação que a proteína Hsp70 apresenta maior homologia entre os protozoários (*Leishmania* e *Toxoplasma*), que entre protozoários e mamíferos.

Ao contrário do que foi observado por Lyons & Johnson (1995), que cepas de baixa virulência de *T. gondii*, não expressam Hsp70, este estudo demonstrou a expressão da proteína em parasitas contidos dentro dos cistos. Embora os estudos anteriores tenham sido elaborados com parasitas obtidos de cultivo *in vivo*, estes foram realizados em taquizoítas e não em parasitas císticos. É possível que, com relação à expressão de Hsps, o comportamento dos parasitas dentro dos cistos seja diferente quando comparados aos taquizoítas livres.

Em concordância com os achados de Lyons & Johnson (1995), a análise por "Western blot" de taquizoítas da cepa ME-49 obtidos de cultivo *in vitro*, não apresentaram a expressão da proteína, enquanto que, taquizoítas da cepa RH que foram obtidos de cultivo *in vivo*, sim.

A expressão da proteína nos cistos cerebrais, coincidiu com a interconversão de estágio do parasita e não foi observada em taquizoítas livres.

Animais tratados com anticorpo monoclonal controle, apresentaram alguns cistos sem marcação ao nível de microscopia de luz e à fotometria a marcação não foi significativa. Como anteriormente citado, durante a execução da análise fotométrica, não é possível discriminar

entre cistos marcados e não marcados, como pode ser feito à microscopia de luz. Provavelmente cistos sem marcação, foram também analisados, diminuindo os valores numéricos da intensidade de marcação.

Tanto os animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ quanto os animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α expressaram a proteína nos cistos cerebrais. A intensidade de marcação foi maior nestes grupos de animais imunossuprimidos que em animais tratados com anticorpo monoclonal controle. O padrão de marcação foi algo semelhante à marcação para antígenos específicos de taquizoítas, P30 e P22. A expressão da proteína foi maior em animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, que animais tratados com anticorpo monoclonal controle, embora a diferença não seja significativa entre animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ e aqueles tratados com anticorpo monoclonal controle. Ao contrário do observado com os antígenos P30 e P22, animais neutralizados de IFN- γ durante 7 dias, não apresentaram marcação maior para a proteína Hsp70 quando comparados com animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias. Isto pode ser reflexo do processo de interconversão estar ocorrendo nos cistos, dos animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias, que estão em maior proporção, do que em animais neutralizados durante 7 dias, que apresentam maior número de taquizoítas em relação ao número de cistos. A neutralização de TNF- α provocou a expressão da proteína Hsp70 de forma semelhante. Provavelmente o efeito de IFN- γ e TNF- α na interconversão de estágio do parasita seja similar. É possível que a proteína seja expressa nos parasitas durante o processo de interconversão bradizoíta-taquizoíta.

A proteína pode ser expressa na diferenciação de diferentes parasitas, sob condições adversas do microambiente (Van Der Ploeg *et al.*, 1985; Polla, 1991; Maresca & Carratú, 1992) ou por outros fatores do parasita durante esta fase (Newport *et al.*, 1988).

Bohne *et al.* (1995) observaram a expressão de uma proteína de 30 kDa (HSP30/BAG1) específica de bradizoítas, durante interconversão de estágio taquizoíta-bradizoíta *in vitro* e também em cistos cerebrais durante infecção crônica. Esta proteína mostra similaridade com proteína de "heat-shock" de plantas e não é expressa em taquizoítas. A expressão regular de HSP30/BAG1 durante desenvolvimento de *T. gondii*, *in vivo*, pode consequentemente ser induzida por fatores de estresse no sistema nervoso central, como por exemplo resposta imune mediada por IFN- γ durante infecção crônica e aguda. A indução da expressão HSP30/BAG1 em bradizoíta implica em um papel desta Hsp na conversão de estágio de *T. gondii* (Gross *et al.*, 1996b). Em cultivo celular de fibroblastos humanos infectados com taquizoítas e sob condições de estresse ambiental, ocorre interconversão de taquizoítas em bradizoítas e expressão de uma proteína de "stress" de 70 kDa (Weiss *et al.*, 1996). A proteína Hsp poderia estar protegendo o parasita, quando exposto a um estresse ambiental para adaptar seu metabolismo e expressão gênica durante a diferenciação de taquizoíta para bradizoíta.

Até a realização deste estudo, a expressão de proteína de choque térmico, não havia sido observada na reativação de uma infecção crônica onde ocorre interconversão bradizoíta-taquizoíta.

A relevância deste estudo se baseia no fato que Hsps parasitárias parecem ser potentes imunógenos (Selkirk *et al.*, 1989), tais proteínas podem ser reconhecidas por linfócitos T $\gamma\delta$ e estimulá-los (Rajasekar *et al.*, 1990; Allison, 1993). Proteínas Hsps e células T $\gamma\delta$ colocalizam em lesões cerebrais de pacientes com esclerose múltipla, provocando autoimunidade (Battistini *et al.*, 1995). De tais fatos surgem a possibilidade que células T $\gamma\delta$, poderiam interagir com Hsps do parasita no sistema nervoso central e induzir uma resposta

imune protetora ou por outro lado, amplificar a resposta, causando lesões teciduais. Estudos adicionais são necessários para verificar estas suposições.

5.7) EXPRESSÃO DE ANTÍGENO DA CEPA PJA NOS CISTOS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII*

Os cistos da cepa ME-49 apresentaram marcação intensa dos parasitas para antígenos da cepa PJA. O antisoro utilizado para detectar antígenos da cepa PJA foi obtido a partir de camundongos BALB/c cronicamente infectados com cistos da referida cepa. O antisoro produzido é policlonal e direcionado contra vários antígenos do parasita, tanto os de fase crônica (bradizoítas), quanto os de fase aguda (taquizoítas). Está bem descrito na literatura que os diferentes estágios do parasita compartilham *in vitro* antígenos comuns (Kasper, 1989; Darcy *et al.*, 1990; Ángel *et al.*, 1991; Makioka *et al.*, 1991; Tomavo *et al.*, 1991). Este antisoro, ao contrário dos antisoros anti-P30 e P22, reconhece vários antígenos nos parasitas dos cistos, justificando a marcação mais intensa verificada.

Cistos cerebrais de animais cujo tecido foi fixado em Bouin-Hollande (animais neutralizados de IFN- γ ou TNF- α), apresentaram uma coloração homogênea e intensa dos cistos, desde animais não neutralizados de IFN- γ (dia zero), até animais neutralizados durante 12 dias ou neutralizados de TNF- α .

O fixador Bouin é constituído por formol, ácido tricloroacético e ácido pícrico (Fernandes, 1949; Behmer *et al.*, 1976). A presença do formol neste fixador, tornou necessário o resgate antigênico em forno microondas. O resgate antigênico realizado em tecidos fixados com este fixador pode ter revelado outros sítios antigênicos, reconhecidos pelo antisoro anti-cepa PJA, não revelados em tecidos que sofreram resgate antigênico e fixação com formol.

Isto explicaria a maior intensidade de marcação nos cistos destes tecidos. Como a marcação mostrou-se intensa desde animais no dia zero de neutralização, não foi possível discriminar com clareza quando a neutralização das citocinas IFN- γ ou TNF- α revelou mais sítios antigênicos.

Antígenos da cepa PJA, foram detectados com maior intensidade em cistos da cepa ME-49 em animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias, que em cistos de animais neutralizados de TNF- α . O padrão de marcação para estes antígenos diferiu do padrão de todas as outras cepas, inclusive de antígenos específicos de taquizoítas P30 e P22. O efeito da ausência de IFN- γ durante 12 dias, pode ter revelado mais sítios especificamente reconhecidos por este antisoro.

Como pôde ser verificado, a cepa ME-49, isolada de um carneiro, compartilha antígenos com a cepa PJA, isolada de um cão.

5.8) EXPRESSÃO DE ANTÍGENO DAS CEPAS RH, PLK, PTgB, CEP NOS CISTOS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. GONDII*

Os antisoros anti-cepas RH, PLK, PTgB, CEP foram produzidos por imunização de coelhos individualmente com taquizoítas de cada cepa. Estes antisoros são policlonais, e reconhecem múltiplos antígenos do estágio de taquizoítas. Como taquizoítas, bradizoítas e oocisto/esporozoíto apresentam antígenos que são comuns (Kasper, 1989; Ángel *et al.*, 1991; Darcy *et al.*, 1990; Makioka *et al.*, 1991; Tomavo *et al.*, 1991), estes antisoros foram aptos a reconhecer também antígenos presentes nos cistos não específicos de taquizoítas, embora não tenha sido possível discriminar antígenos de estágios diferentes.

De um modo geral, a fotometria mostrou que reações desenvolvidas com estes antisoros, apresentaram intensidade de marcação maior que reações desenvolvidas com antisoro anti-P22 e anti-P30, devido ao maior reconhecimento antigênico. Se os cistos continham bradizoítas ou taquizoítas, provavelmente estes antisoros reconheceram antígenos compartilhados entre tais estágios. Em taquizoítas, quando presentes, os antisoros foram capazes de detectar outros antígenos além de P30, como observado pela marcação semelhante em cistos com o uso de antisoro anti-cepa PTgB, que é deficiente em P30.

A imunossupressão dos animais por depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, nem sempre aumentou a expressão de antígenos que foram detectados pelos diferentes antisoros, como seria esperado, pois com a imunossupressão, provavelmente ocorra um aumento da expressão de antígeno de taquizoíta. Animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ apresentaram marcação estatisticamente maior quando se utilizou antisoros anti-cepas PLK e CEP, quando comparados com animais tratados com anticorpo monoclonal controle (anti- β -galactosidase). Entretanto, este fato não foi observado em animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, quando se utilizou antisoro anti-cepas RH, PTgB e PJA. Como foi observado anteriormente, os antígenos P30 e P22, específicos de taquizoítas, foram expressos em maior intensidade neste grupo de animais que os do grupo tratado com anticorpo monoclonal controle e portanto se esperaria uma maior marcação para antígeno de taquizoíta, com o uso de antisoros anti-RH e PTgB. É possível que o compartilhamento antigênico entre a cepa ME-49 e estas cepas não seja tão pronunciado no estágio de taquizoítas.

Animais que sofreram depleção de células T CD8⁺ apresentaram marcação nos cistos cerebrais, frente aos diferentes antisoros, menor que aquela obtida de animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ ou T CD4⁺ e T CD8⁺. Com o uso de alguns antisoros, anti-cepas PLK e CEP esta diferença foi significativa, outros não. Este fenômeno permanece incerto,

desde que células T CD8⁺ são células muito importantes na imunidade efetora contra o *Toxoplasma* (Khan *et al.*, 1991; Subauste *et al.*, 1991; Kasper *et al.*, 1992; Denkers *et al.*, 1993b; Shirahata *et al.*, 1994) e seria de se esperar que houvesse uma detecção de antígenos maior quando se utilizasse antisoro policlonal anti-taquizoíta. Uma possibilidade a se considerar é que mesmo aumentando a expressão de antígeno de taquizoíta, como foi observado com a detecção maior de antígenos P30 e P22 nestes animais, estes antisoros reconhecem antígenos não específicos de taquizoítas e que são compartilhados entre os diferentes estágios da cepa ME-49.

Reações desenvolvidas em cistos de animais que foram neutralizados de IFN- γ ou TNF- α apresentaram a maioria dos parasitas corados, ao nível de microscopia de luz e análises fotométricas. Reações desenvolvidas em tecidos fixados em Bouin-Hollande, desenvolvidas com antisoro anti-cepa PTgB apresentaram marcação homogênea à fotometria e esta foi estatisticamente maior que reações desenvolvidas em tecido fixado em formol a 10%. Este fato foi verificado quando se comparou reações desenvolvidas em tecidos de animais fixados em Bouin-Hollande, e não neutralizados (dia zero) e tecidos de animais fixados em formol a 10% e tratados com anticorpo monoclonal controle (anti- β -galactosidase). Provavelmente o fixador Bouin-Hollande permitiu maior exposição de antígenos, que foram reconhecidos por este antisoro.

Interessantemente, todas as reações desenvolvidas em animais que foram neutralizados de IFN- γ durante 7 ou 9 dias, apresentaram uma marcação maior para antígenos específicos de taquizoítas, P30 e P22 e não específicos como os detectados por estes antisoros. É possível que neste período de neutralização ocorra uma maior ruptura de cistos e liberação de taquizoítas e expressão de antígenos deste estágio do parasita, que nas outras condições de imunossupressão.

Com exceção de reações desenvolvidas com antisoro anti-cepa PJA, a detecção de antígenos específicos e não específicos do estágio de taquizoíta, foi maior em animais neutralizados de TNF- α durante 12 dias, que animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias. O efeito da ausência do TNF- α pode ter revelado mais sítios especificamente reconhecidos por estes antisoros, quando comparado com animais neutralizados de IFN- γ durante 12 dias, ou seja, pode ter havido uma maior interconversão de estágio.

A detecção de antígenos de taquizoítas foi maior na cepa ME-49 de *T. gondii*, em animais neutralizados de TNF- α , do que aqueles animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, quando se utilizou antisoros anti-cepas RH, PLK, e PTgB, com exceção de anti-cepa CEP.

TNF- α é uma importante citocina que atua na imunidade ao *T. gondii*, provavelmente através da indução da produção do óxido nítrico (Gazzinelli *et al.*, 1994b). A deficiência imediata da citocina, como acontece em animais neutralizados de IFN- γ , produz um efeito deletério maior que o efeito de depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺.

Experimentos anteriores mostrando o compartilhamento de antígenos entre diferentes cepas (Ware & Kasper, 1987), foram realizados *in vitro*. Na presente investigação observou-se que, *in vivo*, cepas diferentes também apresentam antígenos que são comuns. A cepa ME-49 compartilha antígenos com cepas de origens diferentes, como as cepas RH, PTgB, CEP e PJA. Esse compartilhamento antigênico, também foi bastante proeminente quando se utilizou o antisoro anti-cepa PLK, mas isto não foi surpreendente, desde que a cepa PLK é um clone da ME-49 e são geneticamente bastante relacionadas (Guo & Johnson, 1995). Esta observação reforça o fato que indivíduos infectados com uma determinada cepa, desenvolvem proteção contra cepas diferentes.

5.9) EXPRESSÃO DE ANTÍGENO DO ESTÁGIO DE OOCISTO NOS CISTOS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 CRONICAMENTE INFECTADOS COM A CEPA ME-49 DE *T. gondii*

Os parasitas nos cistos cerebrais, contendo bradizoítas, de animais cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, expressam antígenos do estágio de oocisto, como anteriormente observado *in vitro* (Kasper, 1989; Ángel *et al.*, 1991).

À fotometria, marcação dos cistos cerebrais para antígeno do estágio de oocisto não foi significante em animais que sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, ou tratados com anticorpo monoclonal controle. Como ao nível de microscopia de luz alguns cistos não expressaram este antígeno, é possível que a análise de tais cistos não marcados à fotometria tenha fornecido este resultado.

A imunossupressão por depleção de T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ não aumentou a expressão do antígeno de oocisto.

A neutralização de IFN- γ por 12 dias, não aumentou a expressão de antígeno de oocisto. Entretanto, a neutralização de TNF- α aumentou significativamente a expressão deste antígeno. A relação entre neutralização de TNF- α e maior expressão de antígeno de oocisto não é clara. É possível que a neutralização da citocina aumente a expressão de antígenos que são comuns entre oocisto/esporozoíto e taquizoíta. Animais neutralizados de IFN- γ por 12 dias ou TNF- α , apresentaram uma expressão considerável de antígenos de taquizoítas P30 e P22; entretanto, esta expressão foi maior em animais neutralizados de TNF- α . Provavelmente, oocistos compartilhem, *in vivo*, mais antígenos com taquizoítas que com bradizoítas, embora em experimentos, *in vitro*, os antígenos detectados por antisoro anti-oocisto/esporozoíto em bradizoítas ou taquizoítas sejam semelhantes (Kasper, 1989).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que a ausência de IFN- γ ou TNF- α promovem a interconversão de estágio nos parasitas císticos, transformando-os de bradizoítas em taquizoítas. Durante este período de interconversão, os parasitas expressam a proteína de choque térmico Hsp70 e, provavelmente esta esteja envolvida na adaptação do parasita durante este evento. Foi também observado que diferentes cepas do parasita compartilham antígenos com a cepa ME-49. Analisadas em conjunto estas observações podem contribuir para o entendimento da reativação de infecção por *T. gondii*, em imunossuprimidos e para estudos relacionados à terapêutica e profilaxia desta protozoose.

Conclusões

6) CONCLUSÕES

A utilização do método indireto, amplificação com o kit ABC e resgate antigênico em forno microondas, foram de importância fundamental no desenvolvimento das reações de imunocitoquímica. Tais reações assim padronizadas permitiram a detecção de antígenos de *Toxoplasma* e proteínas de choque térmico, em tecido cerebral de camundongos C57BL/6, cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*.

IFN- γ e TNF- α são responsáveis pela manutenção de infecção em um estágio latente por *T. gondii*, apresentando bradizoítas encistados. A neutralização das citocinas levou ao rompimento dos cistos e liberação de taquizoítas livres, sendo a presença destes extremamente elevada após 12 dias de neutralização de IFN- γ , ocasião em que a mortalidade dos animais foi de 100%. O agravamento da imunossupressão por neutralização de IFN- γ ou TNF- α também levou ao aumento gradativo do número e diminuição do tamanho dos cistos no cérebro dos animais infectados. Provavelmente os cistos estavam sendo constantemente rompidos e os taquizoítas liberados estavam infectando novas células.

Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, apresentam normalmente uma população heterogênea de parasitas dentro dos cistos, taquizoítas e bradizoítas. Não foi possível definir por este experimento o responsável por tal comportamento, se a linhagem do camundongo ou a cepa do parasita.

O sistema imune do hospedeiro é o responsável pela manutenção dos parasitas encistados, uma vez que a depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, ou neutralização de IFN- γ ou TNF- α promoveram a maior expressão de antígenos de taquizoítas, significando estar ocorrendo interconversão de estágio. Células T CD8⁺ são mais importantes em manter a infecção latente que células T CD4⁺, pois a depleção das primeiras, promove maior expressão de antígenos específicos de taquizoítas, significando interconversão de estágio. Se células T

CD4⁺ e/ou T CD8⁺ são importantes em manter os parasitas na forma latente dentro dos cistos, a atuação delas provavelmente é através da produção de IFN- γ e TNF- α , pois a neutralização de tais citocinas promovem expressão bastante elevada de antígenos P30 e P22 e maior grau de interconversão bradizoíta-taquizoíta.

Durante interconversão de estágio, *in vivo*, *T. gondii* expressa proteínas de "stress", talvez estas estejam envolvidas na adaptação do parasita durante este evento.

A proteína Hsp70, apresenta maior homologia entre protozoários, como *Leishmania* e *Toxoplasma*, do que entre protozoários e mamíferos.

Os parasitas encistados compartilham antígenos comuns com parasitas do estágio de oocisto/esporozoíto.

A cepa ME-49 compartilha, *in vivo*, antígenos comuns com a cepa PLK, um clone derivado da ME-49 e outras cepas diferentes mas também de baixa virulência como as cepas PTgB, CEP e PJA. Antígenos também são compartilhados, *in vivo*, entre as cepas ME-49 e a cepa de alta virulência RH.

Resumo

7) RESUMO

Em imonocomprometidos *T. gondii* ocasiona uma doença grave, possivelmente devido à reativação de infecção crônica, apresentando-se geralmente como encefalite. O presente estudo mostra os resultados de experimentos realizados em cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*. Foram pesquisados os antígenos específicos de taquizoíta P30 e P22, antígenos das cepas PLK, PTgB, CEP, PJA e RH, antígeno do estágio de oocisto, como também a proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp 70) nos cistos cerebrais, através da reação de imunocitoquímica. Os animais sofreram depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ ou foram neutralizados IFN- γ ou TNF- α e a interconversão de estágio de bradizoíta para taquizoíta foi avaliada através da expressão dos antígenos P30 e P22. Foram avaliados também o compartilhamento antigênico entre as diferentes cepas de *T. gondii* acima citadas, com a cepa ME-49, o compartilhamento de antígeno do estágio de oocisto com os parasitas císticos e a expressão da proteína Hsp 70. Foram utilizados sempre 3 animais por grupo e diversos cistos em cada grupo foram analisados. A intensidade de marcação para cada antígeno e tamanho dos cistos foram analisados pelo programa UTHSCSA *Image Tool*, desenvolvido na Universidade do Centro de Ciências da Saúde do Texas, San Antônio, Texas. Avaliou-se também o número de cistos cerebrais em cada condição de imunossupressão. Animais tratados com anticorpo monoclonal anti-CD4⁺ e/ou anti-CD8⁺ apresentaram um número maior de cistos cerebrais que animais tratados com anticorpo monoclonal controle. Este efeito também foi observado em animais tratados com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ ou anti-TNF- α , assim como uma diminuição no tamanho dos cistos. Observou-se que a depleção de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, ou a neutralização de IFN- γ ou TNF- α promoveram a maior expressão de antígenos de taquizoítas, significando estar ocorrendo interconversão de estágio, sendo que o efeito da neutralização de

IFN- γ ou TNF- α foi mais severo. Durante este período de interconversão os parasitas expressam a proteína de choque térmico, Hsp70, provavelmente esta esteja envolvida na adaptação do parasita durante este evento. Os parasitas encistados apresentam também, antígenos comuns com o estágio de oocisto. Cepas diferentes de *T. gondii* compartilham antígenos com a cepa ME-49, quando detectados nas estruturas císticas parasitárias, presentes em cortes de tecido cerebral de animais infectados.

Summary

8) SUMMARY

In immunocompromised states, *T. gondii* produces a severe disease that is thought to originate primarily from reactivation of previously established chronic infection and commonly presents clinically in the form of encephalitis. The present study shows the results of experiments carried out in brain cysts of C57BL/6 mice infected with ME-49 strain of *T. gondii*, in order to detect P30 and P22 specific antigens of tachyzoites, oocyst-sporozoite antigens, PLK, PTgB, CEP, PJA and RH strains antigens and heat shock protein (Hsp 70). The animals were treated *in vivo* with control mAb (anti- β -galactosidase) or neutralizing doses of anti-CD4⁺ and/or anti-CD8⁺, anti-IFN- γ or anti-TNF- α antibodies and the expression of antigens were visualized in the cerebral tissue by immunocytochemistry. Afterwards the cysts images were submitted to photometric and morphometric analysis which were performed by using the UTHSCSA Image Tool program, developed at the University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, USA. The data were obtained from several cysts analyzed from three mice per group. It was observed that CD4⁺ and/or CD8⁺ T cell depleted mice presented cysts number higher than those treated with control mAb. In addition, IFN- γ neutralization during day 7 and so forth or TNF- α neutralization promoted a highest cysts number with the smallest size. It was also observed that anti-IFN- γ or anti-TNF- α antibodies promotes bradyzoite-tachyzoite differentiation. The immunosuppressive effect of anti-IFN- γ or anti-TNF- α was more severe than one of anti-CD4⁺ and/or anti-CD8⁺. During this interconversion period parasites express the heat shock protein, Hsp70. Hsps appear to be involved in parasite adaptation during this event. It also might be shown that different strains share antigens *in vivo* since antibodies against different *T. gondii* strains recognized ME-49 strain antigens and the parasites inside brain cysts express oocyst-sporozoite antigens.

Referências Bibliográficas

9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., KICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. 457 p.
- ADAMS, L.B., HIBBS JUNIOR, J.B., TAINTOR, R.R. *et al.* Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology**, v.144, n.7, p. 2725 - 2729, apr. 1990.
- ALLISON, J.P. $\gamma\delta$ T-cell development. **Current Opinion in Immunology**, v.5, p. 241 - 246, 1993.
- AMORIM FILHO, Antonio Gomes de. A proteína de "heat shock" de 70 kDa de *Leishmania (V.) braziliensis* como alvo da resposta imune humoral na leishmaniose mucocutânea. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1994. 87p. (Dissertação, Mestrado).
- ÁNGEL, J.E., MARINKELLE, C.J., SÁNCHEZ *et al.* Diferenciación antigénica entre tres estadios del ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* mediante anticuerpos fluorescentes. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v.33, p. 257 - 263, 1991.
- BATTIFORA, H., KOPINSKI, M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.34, p. 1095 - 1100, 1986.

- BATTISTINI, L., SALVETTI, M., RISTORI, G. *et al.* Gamma delta T cell receptor analysis supports a role for Hsp70 section of lymphocytes in multiple sclerosis lesions. **Molecular Medicine**, v.1, n.5, p. 554 - 562, jul. 1995.
- BEAMAN, M.H., WONG, S-Y., REMINGTON, J.S. Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism. **Immunological Reviews**, n.127, p. 97 - 117, 1992.
- BEHMER, O.A., TOLOSA, E.M.C., NETO, A.G.F. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: EDART - São Paulo Livraria Editora Ltda, 1976. 241p.
- BOHNE, W., GROSS, U., FERGUSON, D.J.P. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (*hsp30/bag1*) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. **Molecular Microbiology**, v.16, n.6, p. 1221 - 1230, 1995.
- BOHNE, W., HEESEMANN, J., GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v.61, n.3, p. 1141 - 1145, mar. 1993a.
- BOHNE, W., HEESEMANN, J., GROSS, U. Coexistence of heterogeneous populations of *Toxoplasma gondii* parasites within parasitophorous vacuoles of murine macrophages as revealed by a bradyzoite-specific monoclonal antibody. **Parasitology Research**, v.79, p. 485 - 487, 1993b.

BOHNE, W., GROSS, U., HEESEMANN, J. Differentiation between mouse-virulent and -avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kilodalton antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.6, p. 1641 - 1643, jun. 1993c.

BOHNE, W., HEESEMANN, J., GROSS, U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. **Infection and Immunity**, v.62, n.5, p. 1761 - 1767, may 1994.

BOULANGER, F., BONHOMME, A., LEBONVALLET, S. *et al.* Quantitative immunolocalization of four immunodominant antigens of *Toxoplasma gondii*. **Biology of the Cell**, v.73, p. 89 - 97, 1991.

BROWN, C.R., HUNTER, C.A., ESTES, R.G. *et al.* Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma gondii* burden and encephalitis. **Immunology**, v.85, p. 419 - 428, 1995.

BROWN, C.R., MCLEOD, R. Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. **The Journal of Immunology**, v.145, n.10, p. 3438 - 3441, nov. 1990.

- CANDOLFI, E., HUNTER, C.A., REMINGTON, J.S. Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and *Toxoplasma* antigen during acute toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v.63, n.3, p. 751 - 756, mar. 1995.
- CESBRON-DELAUW, M.F., CAPRON, A. Excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*-their origin and role in the host-parasite interaction. **Research in Immunology**, v.144, n.1, p. 41 - 44, 1993.
- CESBRON-DELAUW, M.F., GUY, B., TORPIER, G. *et al.* Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America.**, v.86, p. 7537 - 7541, oct. 1989.
- CHANNON, J.Y., KASPER, L.H. *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. **Infection and Immunity**, v.64, n.4, p. 1181 - 1189, apr. 1996.
- CHAO, C.C., GEKKER, G., HU, S. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. **Journal of Immunology**, v.152, p. 1246 -1252, 1994.
- CHARIF, H., DARCY, F., TORPIER, G. *et al.* *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. **Experimental Parasitology**, v.71, p. 114 - 124, 1990.

COUVREUR, G., SADAK, A., FORTIER, B. *et al.* Surface antigens of *Toxoplasma gondii*.

Parasitology, v.97, p. 1 -10, 1988.

COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H. **Current Protocols in**

Immunology, v.1. USA: John Wiley & Sons, Inc., 1994.

DARCY, F., CHARIF, H., CARON, H. *et al.* Identification and biochemical characterization

of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive

epitopes. **Parasitology Research**, v.76, p. 473 - 478, 1990.

DAVIS, M.M., CHIEN, Y-H. Issues concerning the nature of antigen recognition by $\alpha\beta$ and

$\gamma\delta$ T-cell receptors. **Immunology Today**, v.16, n.7, p. 316 - 317, 1995.

DECKERT-SCHLUTER, M., ALBRECHT, S., HOF, H. *et al.* Dynamics of the intracerebral

and splenic cytokine mRNA production in *Toxoplasma gondii*-resistant and -susceptible

congenic strains of mice. **Immunology**, v. 85, p. 408 - 418, 1995.

DECKERT-SCHLUTER, M., SCHLUTER, D., HOF, H. *et al.* Defferential expression of

ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4 and MHC Class II

antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: A light microscopic and ultrastructural

immunohistochemical study. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**,

v.53, n.5, p. 457 - 468, sep. 1994.

- DENKERS, E.Y., GAZZINELLI, R.T., MARTIN, D. Emergence of NK1.1⁺ cells as effectors of IFN- γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.178, n.5, p.1465 - 1472, nov. 1993a.
- DENKERS, E.Y., SHER, A., GAZZINELLI, R.T. CD8⁺ T-cell interactions with *Toxoplasma gondii*: implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. **Research in Immunology**, v.144, n.1, p. 51 - 57, 1993b.
- DE PAOLI, P., BASAGLIA, G., GENNARI, D. *et al.* Phenotypic profile and functional characteristics of human gamma and delta T cells during acute toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.3, p. 729 - 731, mar. 1992.
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of toxoplasma cysts. **The Journal of Protozoology**, v.23, n.4, p. 537 - 546, nov. 1976.
- DUBEY, J.P., PETERS, D., BROWN, C. Na unidentified *Toxoplasma*-like tissue cyst-forming coccidium in a cat (*Felis catus*). **Parasitology Research**, v.78, p. 39 - 42, 1992.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J. **Parasitic Protozoa**. v. 3, New York: Academic Press. p. 101 - 237. apud JACKSON, M.H., HUTCHISON, W.M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55 - 105, 1989.

- DVORAK, J.A., CRANE, M.St.J. Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. **Science**, v.214, p. 1034 -1036, 1981.
- FALANGOLA, M.F., PETITO, C.K. Choroid plexus infection in cerebral toxoplasmosis in AIDS patients. **Neurology**, v.43, p. 2035 - 2040, 1993.
- FELDMAN, H.A. Epidemiology of *Toxoplasma* infections. **Epidemiologic Reviews**, v.4, p. 204 - 213, 1982.
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M. An ultrastructural study fo the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in brains of mice. **Parasitology Research**, v.73, p. 483 - 491, 1987a.
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. **Virchows Archiv A**, v.411, n.1, p. 39 - 43, apr. 1987b.
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M., PETTERSEN, E. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 75, p. 599 - 603, 1989.
- FERGUSON, D.J.P., HUSKINSON-MARK, J., ARAUJO, F.G. *et al.* A morphological study of chronic cerebral toxoplasmosis en mice: comparison of four different strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v.80, p. 493 - 501, 1994.

- FERNANDES, M.C. **Métodos Escolhidos de Técnica Microscópica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1949. 615p.
- FORSDYKE, D.R. Heat shock proteins defend against intracellular pathogens: a non-immunological basis for self/non-self discrimination? **Journal of Theoretical Biology**, v.115, n.3, p. 471 - 473, aug. 1985.
- FOX, C.H., JOHNSON, F.B., WHITING, J. *et al.* Formaldehyde fixation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 33, p. 845 - 853, 1985.
- FRENKEL, J.K., ESCAJADILLO, A. Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.36, n.3, p. 517 - 522, 1987.
- FURTADO, G.C., SLOWIK, M., KLEINMAN, H.K. *et al.* Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. **Infection and Immunity**, v.60, n.6, p. 2337 - 2342, jun. 1992a.
- FURTADO, G.C., CAO, Y., JOINER, K.A. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the $\beta 1$ integrin receptor $\alpha 6\beta 1$ on human foreskin fibroblasts and chinese hamster ovary cells. **Infection and Immunity**, v.60, n.11, p. 4925 - 4931, nov. 1992b.
- GARNHAM, P.C.C., BAKER, J.R., BIRD, R.G. Fine structure of cystic form of *Toxoplasma gondii*. **British Medical Journal**, v.1, p. 83 - 84, jan. 1962.

- GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HIENY, S. *et al.* 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.
- GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S. *et al.* Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v.153, p. 2533 -2543, 1994a.
- GAZZINELLI, R.T., BRÉZIN, A., LI, Q. *et al.* *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α and IFN- γ . **Experimental Parasitology**, v.78, p. 217 - 229, 1994b.
- GAZZINELLI, R.T., ELTOUM, I., WYNN, T.A. *et al.* Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF- α and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **The Journal of Immunology**, v.151, n.7, p. 3672 - 3681, oct. 1993.
- GAZZINELLI, R., YUHUI, X., HIENY, S. *et al.* Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v.149, n.1, p. 175 - 180, jul. 1992.

- GAZZINELLI, R.T., HAKIM, F.T., HIENY, S. *et al.* Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by na attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v.146, n.1, p. 286 - 292, jan. 1991.
- GEHRMANN, J., MATSUMOTO, Y., KREUTZBERG, G.W. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. **Brain Research Reviews**, v.20, p. 269 - 287, 1995.
- GLASNER, P.D., SILVEIRA, C., KRUSZON-MORAN, D. *et al.* Na unusually high prevalence of ocular toxoplasmoses in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v.114, p. 136 - 144, aug. 1992.
- GOSSELIN, E.J., CATE, C.C., PETTENGILL, O.S. *et al.* Immunocytochemistry: its evolution and criteria for its application in the study of epon-embedded cells and tissue. **The American Journal of Anatomy**, v.175, p. 135 - 160, 1986.
- GOYAL, M., GANCULY, N.K., MAHAJAN, R.C. Immunological response in experimentally reactivated toxoplasmosis in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.178, p. 269 - 278, 1989.
- GRIMWOOD, J., MINEO, J.R., KASPER, L.H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. **Infection and Immunity**, v.64, n.10, p. 4099 - 4104, oct. 1996.

- GRIMWOOD, J., SMITH, J.E. *Toxoplasma gondii*: redistribution of tachyzoite surface protein during host cell invasion and intracellular development. **Parasitology Research**, v.81, p. 657 - 661, 1995.
- GRIMWOOD, J. SMITH, J.E. *Toxoplasma gondii*: the role of a 30 kDa surface protein in host cell invasion. **Experimental Parasitology**, v.74, p. 106 - 111, 1992.
- GROSS, U., MULLER, W.A., KNAPP, S. *et al.* Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 12, p. 4511 - 4516, dec. 1991.
- GROSS, U., BOHNE, W. *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation. **J. Euk. Microbiol.**, v.41, n.5, p. 10S - 11S, sep-oct. 1994.
- GROSS, U., BOHNE, W., LUDER, C.G.K. *et al.* Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J. Euk. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 114S - 116S, sep-oct. 1996a.
- GROSS, U., BOHNE, W., SOËTE, M. *et al.* Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 12, n. 1, p. 30 - 33, 1996b.
- GUO, Z.G., JOHNSON, M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Parasitology**, v.111, p. 127 - 132, 1995.

- HANDERLY, D.E., GENSTLER, A.J., SMITH, R.E. *et al.* Changing patterns of uveitis. **American Journal of Ophthalmology**, v.103, p. 131 - 136, 1987.
- HAQUE, S., KHAN, I., HAQUE, A. *et al.* Impairment of the immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. **Infection and Immunity**, v.62, n.7, p. 2908 - 2916, jul. 1994.
- HART, M.N., FABRY, Z. CNS antigen presentation. **Trends in Neuroscience**, v.18, n.11, p. 475 - 481, 1995.
- HAUSER, W.E., SHARMA, S.D., REMINGTON, J.S. Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v.131, p. 458 - 463, 1983.
- HAUSER, W.E., TSAI, V. Acute toxoplasma infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* in vitro. **The Journal of Immunology**, v.136, p. 313 - 319, 1986.
- HAYASHI, S., CHAN, C.C., GAZZINELLI, R.T. *et al.* Protective role of nitric oxide in ocular toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v.80, n.7, p. 644 - 648, jul. 1996a.
- HAYASHI, S., CHAN, C.C., GAZZINELLI, R.T. *et al.* Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. **The Journal of Immunology**, v.156, n.4, p. 1476 - 1481, feb. 1996b.

- HISAEDA, H., NAGASAWA, H., MAEDA, K-I. *et al.* $\gamma\delta$ T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v.154, p. 244 - 251, 1995.
- HISAEDA, H., SAKAI, T., NAGASAWA, H. *et al.* Contribution of extrathymic $\gamma\delta$ T cells to the expression of heat-shock protein and to protective immunity in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Immunology**, v.88, p. 551 - 557, 1996.
- HOWE, D.K., SUMMERS, B.C., SIBLEY, L.D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.64, n.12, p. 5193 - 5198, 1996.
- HUNTER, C.A., REMINGTON, J.S. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.170, p. 1057 - 1067, 1994.
- HUNTER, C.A., ROBERTS, C.W., ALEXANDER, J. Kinetics of cytokine mRNA production in the brains of mice with progressive toxoplasmic encephalitis. **European Journal of Immunology**, v.22, p. 2317 - 2322, 1992.
- HUNTER, C.A., SUBAUSTE, C.S., CLEAVE, V.H.V. *et al.* Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**, v.62, n.7, p. 2818 - 2824, 1994.

- HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F., WORK, K. The faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. **Acta Path. Microbiol. Scandinav.**, v.74, p. 462 - 464, 1968.
- JACKSON, M.H., HUTCHISON, W.M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v.28, p. 55 - 105, 1989.
- JACOBS, L., REMINGTON, J.S., MELTON, M.L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v.46, p. 11 - 21, 1960 apud LUNDE, M.N., JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v.69, n.5, p. 806 - 808, 1983.
- JOHNSON, L.L., GIBSON, G.W., SAYLES, P.C. *Toxoplasma gondii*: effect of sublethal irradiation on host resistance in mice. **Experimental Parasitology**, v.81, p. 172 - 181, 1995.
- JOINER, K. Cell attachment and entry by *Toxoplasma gondii*. **Behring Inst. Mitt.**, n.88, p. 20 - 26, 1991.
- 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.
- JONES, T.C., BIENZ, K.A., ERB, P. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. **Infection and Immunity**, v.51, n.1, p. 147 - 156, jan. 1986.

- JONES, T.C., ERB, P., H-2 complex - linked resistance in murine toxoplasmosis. **The Journal of Infectious diseases**, v.151, n.4, p. 739 - 740, apr. 1985.
- KANETO, C.N., COSTA, A.J., PAULILLO, A.C. *et al.* Experimental toxoplasmosis en broiler chicks. (in press).
- KASPER, L.H. Identification of Stage-Specific Antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.57, n.3, p. 668 - 672, mar. 1989.
- KASPER, L.H., BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: WARREN, K.S. **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. 3.ed. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1993. 610p.
- KASPER, L.H., MATSUURA, T., KHAN, I.A. IL-7 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v.155, n.10, p. 4798 - 4804, 1995.
- KASPER, L.H., MINEO, J.R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v.10, n.5, p. 184 - 188, 1994.
- KASPER, L.H., KHAN, I.A., ELY, K.H. *et al.* Antigen-specific (p30) mouse CD8⁺ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v.148, n.5, p. 1493 - 1498, mar. 1992.

KASPER, L.H., WARE, P.L. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. **Journal of Clinical Investigative**, v.75, p. 1570 - 1577, may 1985.

KASPER, L.H., BRADLEY, M.S., PFEFFERKORN, E.R. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. **Journal of Immunology**, v.132, p. 443 - 449, 1984.

KASPER, L.H., CRABB, J.H., PFEFFERKORN, E.R. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. **The Journal of Immunology**, v.130, n.5, p. 2407 - 2412, may 1983.

KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular microbial pathogens. **Immunology Today**, v.16, n.7, p. 338 - 342, 1995.

KHAN, I.A., ELY, K.H., KASPER, L.H. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8⁺ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. **The Journal of Immunology**, v.147, n.10, p. 3501 - 3506, nov. 1991.

KHAN, I.A., MATSUURA, T., KASPER, L.H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Parasite Immunology**, v.17, n.4, p. 185 - 195, apr. 1995.

- KIMATA, I., TANABE, K. Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. **Journal of Cell Science**, v.88, part 2, p. 231 - 239, sep. 1987.
- KOGA, T., WAND-WUTTENBERGER, A., DEBRUYN, J. *et al.* T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages. **Science**, v.245, p. 1112 - 1115, 1989.
- KRICK, J.A., REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in the adult: an overview. **New England Journal of Medicine**, v.298, p. 550 - 553, 1978 apud PAVESIO, C.E.N., CHIAPPINO, M.L., SETZER, P.Y. *et al.* *Toxoplasma gondii*: differentiation and death of bradyzoites. **Parasitology Research**, v.78, p. 1 - 9, 1992.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680 - 685, 1970.
- LAINSON, R. Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts of *Toxoplasma gondii*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, n.5, p. 396 - 407, jan. 1958.
- 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, n. 2, p. 568 - 574, jan. 1992.

- LIMA, L.A.A. Toxoplasmose e AIDS. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v.155, n. 4, p. 232 - 235, out/dez. 1995.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. *et al.* Protein measurement with the folinphenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265 - 275, 1951.
- LUNDE, M.N., JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v.69, n.5, p. 806 - 808, 1983.
- LYONS, R.E., JOHNSON, A.M. Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v.17, p. 353 - 359, 1995.
- MAKIOKA, A., SUZUKI, Y., KOBAYASHI, A. Recognition of tachyzoite and bradyzoite antigens of *Toxoplasma gondii* by infected hosts. **Infection and Immunity**, v.59, n.8, p. 2763 - 2766, 1991.
- MARESCA, B., CARRATU, L. The biology of heat shock response in parasites. **Parasitology Today**, v.8, p. 260 - 266, 1992.
- MCHUGH, T.D., GBEWONYO, A., JOHNSON, J.D. *et al.* Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. **FEMS Microbiology Letters**, v.114, n.3, p. 325 - 332, dec. 1993.

- MCKNIGHT, A.J., ZIMMER, G.J., FOGELMAN, I. *et al.* Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v.152, p. 2172 - 2179, 1994.
- MCLEOD, R., SKAMENE, E., BROWN, C.R., *et al.* Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of AxB/BxA recombinant inbred and B10 congenic mice. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 9, p. 3031 - 3034, nov. 1989.
- MCLEOD, R., MACK, D., BROWN, C. *Toxoplasma gondii*-new advances in cellular and molecular biology. **Experimental Parasitology**, v.72, p. 109 - 121, 1991.
- MINEO, J.R., KHAN, I.A., KASPER, L.H. *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. **Experimental Parasitology**, v.79, p. 351 - 361, 1994.
- MINEO, J.R., KASPER, L.H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**, v.79, p. 11 - 20, 1994.
- MINEO, J.R., MCLEOD, R., MACK, D. *et al.* Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **The Journal of Immunology**, v.150, n.9, p. 3951 - 3964, may 1993.

- MINEO, J.R., CAMARGO, M.E., FERREIRA, A.W. Enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v.27, p. 283 - 287, 1980.
- MOSMANN, T.T., CHERWINSKI, H., BOND, M.W. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v.136, p. 2348 - 2352, 1986.
- NAGASAWA, H., HISAEDA, H., MAEKAWA, Y. *et al.* $\gamma\delta$ T cells play a crucial role in the expression of 65000 MW heat-shock protein in mice immunized with *Toxoplasma* antigen. **Immunology**, v.83, p. 347 - 352, 1994.
- NAGASAWA, H., OKA, M., MAEDA, K-i. *et al.* Induction of heat shock protein closely correlates with protection against *Toxoplasma gondii* infection. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v.89, p. 3155 - 3158, apr. 1992.
- NAGASAWA, H., MANABE, T., MAEKAWA, Y. *et al.* Role of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cell subsets in protective immune responses of mice against infection with a low or high virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Immunology**, v.35, n.3, p. 215 - 222, 1991.

NATHAN, C.F., MURRAY, H.W., WIEBE, M.E. *et al.* Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage: oxidative metabolism and antimicrobial activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v.158, p. 670, 1983 apud BEAMAN, M.H., WONG, S-Y., REMINGTON, J.S. Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism. **Immunological Reviews**, n.127, p. 97 - 117, 1992.

NEWPORT, G., CULPEPPER, J., AGABIAN, N. Parasite heat-shock proteins. **Parasitology Today**, v.4, n. 11, p. 306 - 312, 1988.

NUSSENBLATT, R.B., MITTAL, K.K., FUHRMAN, S. *et al.* Lymphocyte proliferative responses of patients with ocular toxoplasmosis to parasite and retinal antigens. **American Journal of Ophthalmology**, v.107, p. 632 - 641, jun. 1989.

OMATA, Y., IGARASHI, M., RAMOS, M.I. *et al.* *Toxoplasma gondii*: Antigenic differences between endozoites and cystozoites defined by monoclonal antibodies. **Parasitology Research**, v.75, p. 189 - 193, 1989.

OPPENHEIM, J.J., NETA, R. Pathophysiological roles of cytokines in development, immunity, and inflammation. **The FASEB Journal**, v.8, p. 158 - 162, feb. 1994.

OSSORIO, P.N., SCHWARTZMAN, J.D., BOOTHROYD, J.C. A *Toxoplasma gondii* rhoptry associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.50, n.1, p. 1 - 16, jan. 1992.

PARMLEY, S.F., YANG, S., HARTH, G. *et al.* Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.66, p. 283 - 296, 1994.

PARMLEY, S.F., SGARLATO, G.D., MARK, J. *et al.* Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.5, p. 1127 - 1133, may 1992.

PAVESIO, C.E.N., CHIAPPINO, M.L., SETZER, P.Y. *et al.* *Toxoplasma gondii*: differentiation and death of bradyzoites. **Parasitology Research**, v.78, p. 1 - 9, 1992.

PEETERMANS, W.E., RAATS, C.J., VAN FURTH, R. *et al.* Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein induces tumor necrosis factor alpha and interleukin 6, reactive nitrogen intermediates, and toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v.63, n.9, p. 3454 - 3458, sep. 1995.

PERKINS, E.S. Ocular toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v.57, p. 1 - 17, 1973 apud ROTHOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v.77, p. 371 -377, 1993.

PFEFFERKORN, E.R. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In: WYLER, D.J. **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects**. New York: W.H. Freeman, 1990.

PFEFFERKORN, E.R., ECKEL, M., REBHUN, S. Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.20, p. 215 - 224, 1986.

POLLA, B. S. Heat shock proteins in host-parasite interactions. **Immunology Today**, v.12, p. A38 - A41, 1991.

POLLA, B.S., KANTENGWA, S. Heat shock proteins and inflammation. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.167, p. 93 - 105, 1991.

PRIGIONE, I., FACCHETTI, P., GHIOTTO, F. *et al.* *Toxoplasma gondii*-specific CD4⁺ T cell clones from healthy, latently infected humans display a Th0 profile of cytokine secretion. **European Journal of Immunology**, v.25, p. 1298 - 1305, 1995.

RAJASEKAR, R., SIM, G-K., AUGUSTIN, A. Self heat shock and $\gamma\delta$ T-cell reactivity. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v.87, p. 1767 - 1771, mar. 1990.

RALL, G.F., MUCKE, L., OLDSTONE, M.B. Consequences of cytotoxic T lymphocyte interaction with major histocompatibility complex class I-expressing neurons in vivo. **Journal Experimental Medicine**, v.182, n.5, p. 1201 - 1212, nov. 1995.

REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1991. 731p.

ROBERTS, C.W., FERGUSON, D.J.P., JEBBARI, H. *et al.* Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v.64, n.3, p. 897 -904, 1996.

ROSE, N.R., MACARIO, E.C., FAHEY, J.L. *et al.* **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992. 987p.

ROTHOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v.77, p. 371 -377, 1993.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**, v.116, p. 801 -807, 1941.

SAIJA, A., PRINCI, P., LANZA, M. *et al.* Systemic cytokine administration can affect blood-brain barrier permeability in the rat. **Life Sciences**, v. 56, n. 10, p. 775 - 784, 1995.

SCHARTON-KERSTEN, T., DENKERS, E.Y., GAZZINELLI, R.T. *et al.* Role of IL-12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Research in Immunology**, 62nd forum in immunology, p. 539 - 544, 1995.

SCHLUTER, D., HEIN, A., DORRIES, R. *et al.* Different subsets of T cells in conjunction with natural killer cells, macrophages, and activated microglia participate in the intracerebral immune response to *Toxoplasma gondii* in athymic nude and immunocompetent rats. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 4, p. 999 - 1007, apr. 1995.

SELKIRK, M.E., DENHAM, D.A., PARTONO, F. et al. Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in brugian filariasis. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 1, p. 299 - 308, jul. 1989.

SHARMA, H. M., KAUFFMAN, M., MCGAUGHY, V.R. Improved immunoperoxidase staining using microwave slide drying. **Laboratory Medicine**, v. 21, n. 10, p. 658 - 660, oct. 1990.

SHARMA, S.D. Immunology of toxoplasmosis. In: WYLER, D.J. **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects**. New York: W. H. Freeman, 1990

SHARMA, S.D., MULLENAX, J., ARAUJO, J.G. et al. Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 131, n. 2, p. 977 - 983, aug. 1983.

SHER, A., GAZZINELLI, R.T., OSWALD, I.P. et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunological Reviews**, n. 127, p. 183 - 204, 1992.

SHIRAHATA, T., YAMASHITA, T., OHTA, C. et al. CD8⁺ T Lymphocytes are the major cell population involved in the early gamma interferon response and resistance to acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 38, n. 10, p. 789 - 796, 1994.

- SHI, S.R., KEY, M.E., KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39, p. 741 - 748, 1991.
- SIBLEY, L.D. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. **Trends in Cell Biology**, v. 5, p. 129 - 132, mar. 1995.
- 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.
- SILVEIRA, C., BELFORT Jr, R. BURNIER Jr, M. et al. Acquired toxoplasmic infection as a cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. **American Journal of Ophthalmology**, v. 106, p. 362 - 364, 1988.
- SIMS, T.A., HAY, J., TALBOT, I.C. Ultrastructural immunocytochemistry of the intact tissue cyst of *Toxoplasma* in the brains of mice with congenital toxoplasmosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 141 - 147, 1990.
- SOËTE, M., DUBREMETZ, J.F. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion in vitro. In: GROSS, U. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. Wurzburg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996. 274p. p. 75 - 80.

SOËTE, M., CAMUS, D., DUBREMETZ, J.F. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*.

Experimental Parasitology, v. 78, p. 361 - 370, 1994.

SOËTE, M., FORTIER, B., CAMUS, D. et al. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 76, p. 259 - 264,

1993.

STREET, N.E., SCHUMACHER, J.H., FONG, T.A.T. et al. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. **The Journal of Immunology**, v. 144, p. 1629, 1990.

SUBAUSTE, C.S., CHUNG, J.Y., DO, D. et al. Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma delta T cells in response to *Toxoplasma gondii* *in vitro* and their cytokin production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells. **Journal of Clinical Investigative**, v. 96, n. 1, p. 610 - 619, jul. 1995.

SUBAUSTE, C.S., KONIARIS, A .H., REMINGTON, J.S. Murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. **The Journal of Immunology**, v. 147, n.11, p. 3955 - 3959, dec. 1991.

SUZUKI, Y., YANG, Q., REMINGTON, J.S. Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n.6, p. 1032 - 1034, 1995.

SUZUKI, Y., ORELLANA, M.A., WONG, W-Y. *et al.* Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 6, p. 2284 - 2288, jun. 1993.

SUZUKI, Y., JOH, K., ORELLANA, M.A. *et al.* A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. **Immunology**, v. 74, p. 732 - 739, 1991.

SUZUKI, Y., CONLEY, F.K., REMINGTON, J.S. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 4, p. 790 - 794, apr. 1989a.

SUZUKI, Y., CONLEY, F.K., REMINGTON, J.S. Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 6, p. 2045 - 2050, sep. 1989b.

SUZUKI, Y., ORELLANA, M.A., SCHREIBER, R.D. *et al.* Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, p. 516 - 518, apr. 1988.

TABBARA, K.F. Disruption of the choroidoretinal interface by *Toxoplasma*. **Eye**, v. 4, p. 366 - 373, 1990.

TIZARD, I.R. **Immunology, an introduction**. 4.Ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1995. 544p.

TOMAVO, S., FORTIER, B., SOETE, M. et al. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 15, p. 3750 - 3753, oct. 1991.

TORPIER, G., CHARIF, H., DARCY, F. et al. *Toxoplasma gondii*: Differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. **Experimental Parasitology**, v. 77, p. 13 - 22, 1993.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T. GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350 - 4356, 1979.

TRIPP, C.S., WOLF, .F., UNANUE, E.R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listerioses, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 3725 - 3729, apr. 1993.

VANBUSKIRK, A., GRUMP, B.L., MARGOLIASH, E. at al. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, p. 1799 - 1809, dec. 1989.

VAN DER PLOEG, L.H.T., GIANNINI, S.H., CANTOR, C.R. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. **Science**, v. 228, p. 1443 - 1446, jun. 1985.

VOLLMER, L.T., WALDOR, M.K., STEINMAN, L. et al. Depletion of CD4⁺ lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system: a model of sperinfection in AIDS. **The Journal of Immunology**, v. 138, p. 3737 - 3741, 1987.

WARE, P.L., KASPER, L.H. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 3, p. 778 - 783, mar. 1987.

WATANABE, H., SUZUKI, Y., MAKINO, M. et al. *Toxoplasma gonii*: Induction of toxoplasmic encephalitis in mice with chronic infection by inoculation of a murine leukemia virus inducing immunodeficiency. **Experimental Parasitology**, v. 76, p. 39 - 45, 1993.

WEISS, L.M., LAPLACE, D., TAKVORIAN, P. et al. The association of the stress response and *Toxoplasma gondii* bradyzoite development. **Journal of Eukariotical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 120S, sep./oct. 1996.

WEISS, L.M., LAPLACE, D., TANOWITZ, H.B. et al. Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific monoclonal antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 213 - 215, 1992.

WEISS, L.M., LAPLACE, D., TAKVORIAN, P.M. et al. Development of bradyzoites of *Toxoplasma gondii* in vitro. **Journal Eukariotical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 18S, 1994.

- WERK, R. Biology of *Toxoplasma gondii* host cell entry: the role of recognition and attachment for invasion of host cells. In: MOULDER, J.W. **Intracellular Parasitism**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1989.
- WILSON, C.B., REMINGTON, J.S., STAGNO, S. Development of adverse sequelae in children born with subclinical toxoplasma infection. **Pediatrics**, v. 66, p. 767 - 774, 1980.
- WOODISON, G., SMITH, J.E. Identification of the dominant cyst antigens of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 100, p. 389 - 392, 1990.
- WOODISON, G., BALFOUR, A.H., SMITH, J.E. Sequential reactivity of serum against cyst antigens in *Toxoplasma* infection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, p. 548 - 550, 1993.
- ZHANG, Y.W., SMITH, J.E. *Toxoplasma gondii*: Identification and characterization of a cyst molecule. **Experimental Parasitology**, v. 80, p. 228 - 233, 1995.

Agradeço a Deus por este trabalho.