

Universidade Federal de Uberlândia

Centro de Ciências Biomédicas

Curso de Pós-Graduação em Imunologia

e Parasitologia Aplicadas

MON
616.911.2-1
M 3 i
709.45.01

**Influência da via de infecção na resposta imune
de camundongos BALB/c infectados com a
cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii***

Guilherme Rosemberg Guimarães Queiroz

DIRBI/UFU



1000183412

Uberlândia

1998

Guilherme Rosemberg Guimarães Queiroz

**Influência da via de infecção na resposta imune
de camundongos BALB/c infectados com a
cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii***

**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

CO-ORIENTADORA: PROFa. Dra. MARIA A. DE SOUZA

Uberlândia - 1998

Este trabalho é dedicado à memória de
Elza Gullaci Guimarães,
Rosalina Gullaci Guimarães e
Giuliana Cristina Guimarães Queiroz.
Minha avó, minha mãe e minha irmã....
saudades!

*"...I might be just beginning,
I might be near the end"*

Enya

"...e há tempos nem os santos,
têm ao certo a medida da maldade;
e há tempos são os jovens que adoecem;
e há tempos o encanto está ausente e
há ferrugem nos sorrisos e só o acaso estende
os braços a quem procura abrigo e proteção:
Meu amor, disciplina é liberdade,
compaixão é fortaleza, ter bondade é ter coragem.
Ela disse: lá em casa tem um poço, mas a água é muito limpa!"

Renato Russo

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, por um dia ter me estendido a sua mão, pela sua orientação e por ter aumentado o meu senso crítico.

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza, pelo exemplo de vida, por sua co-orientação, extrema paciência e espírito solidário.

À Profa. Deise Aparecida Oliveira Silva, pelas suas sugestões, sua ajuda e empenho incondicional neste trabalho e ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi pelas sugestões e apoio.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva pelas matrizes de camundongos BALB/c e ao Prof. Dr. Ricardo T. Gazzinelli por ceder seu laboratório e materiais para a dosagem de citocinas.

À Dra. Catherine Ropert, do Centro de Pesquisa René Rachou - Fio Cruz de Belo Horizonte, pelo empenho e orientação nos ensaios de dosagem das citocinas e óxido nítrico.

À todos os professores do curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, em especial aos professores: Dr. Uriel Franco Rocha (UFU), Dr. David George Francis (UFU) e Dr. Wanderley Rodrigues da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Aos colegas e amigos do mestrado e do Laboratório de Imunologia: Silvia, Patrícia, Alexandre, Geraldo, Hercílio, Elisangela, Hugo, Maria

Aparecida, Ronize, Profa. Flávia, Eleusa, Andréa, Solange, Fernanda, Gabriela, Tiago, João, Omar, Elaine, Marta, Kely, Maria de Fátima, Profa. Erika, Prof. Rodolfo, Max, Sidiney, Aurélia, Waldemar, Mônica, Aldo, Gustavo e Prof. Silvio. Especialmente aos amigos: Elizabeth, por sua pronta colaboração; Neide, por suas sugestões e por me receber em Belo Horizonte; Simone, pelo auxílio na manutenção dos camundongos. Muito especialmente aos amigos Antônio Tomás (Junão) e Hélio Júnior (Juninho), pelo auxílio na manutenção dos camundongos e cepas de *Toxoplasma gondii* e pelos diversos esforços que contribuíram, fundamentalmente, para a realização deste trabalho.

Aos amigos, colegas e professores do Departamento de Fisiologia da UFU, especialmente aos Professores Galo, Sidiney e César e aos funcionários Antônio, Hélio, Reis, Elizabeth, Meire e ao saudoso José Custódio (Zézinho).

Ao secretário do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, João Martins Neto, por sua amizade e por seu auxílio constante.

Aos professores Antônio Jorge Bertolini e Cora Pavan Caparelli, duas pessoas muito especiais.

À família Collares, especialmente à Fernanda, por tudo o que é, fez e representa e ao Felipe.

À todos os meus familiares, em especial ao meu irmão Alexandre e ao meu sobrinho Renato.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho através da influência diária de suas vidas em meu viver.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

ABREVIATURAS

SCID	Camundongo com imunodeficiência severa combinada
IFN- γ	Interferon gama
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
NK	Células "natural killer"
IgG1	Imunoglobulina do isotipo G1
IgG2a	Imunoglobulina do isotipo G2a
IgG2b	Imunoglobulina do isotipo G2b
IgG3	Imunoglobulina do isotipo G3
IgE	Imunoglobulina do isotipo E
IgM	Imunoglobulina do isotipo M
FcR1	Receptor 1 da porção Fc das imunoglobulinas

Con-A	Concanavalina A
STA	Antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	15
3 - MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 - Animais	16
3.2 - Parasitas	16
3.3 - Preparação do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> (STA)	17
3.4 - Análise eletroforética do STA	18
3.5 - Análise da sobrevivência de camundongos BALB/c	19
3.6 - Infecção dos camundongos e coleta de sangue	19
3.7 - Análise da reatividade de soros anti-<i>T. gondii</i>	20
3.7.1 - Detecção e titulação de anticorpos gamaglobulínicos totais anti-<i>T. gondii</i>	20
3.7.2 - Detecção de anticorpos IgA anti-<i>T. gondii</i> pelo método de ELISA	21
3.7.3 - Detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-<i>T. gondii</i>	22
3.7.4 - "Western-blot"	22
3.8 - Coleta de órgãos	24
3.9 - Cultura de células	24
3.10 - Dosagem de citocinas e óxido nítrico (nitrito)	25
3.10.1 - Dosagem de IFN-γ	26
3.10.2 - Dosagem de IL-12 p40	27
3.10.3 - Dosagem de IL-10	27
3.10.4 - Dosagem de IL-4	28
3.10.5 - Dosagem de óxido nítrico (nitrito)	28

1 - INTRODUÇÃO

O filo Apicomplexa compreende parasitas intracelulares obrigatórios, que são considerados altamente adaptados e conseguem habilmente invadir e se desenvolver dentro das células hospedeiras. Este grupo tem ciclos de vida tipicamente complexos em que cada forma de evolutiva interage com células específicas de uma única espécie de hospedeiro. O protozoário *Toxoplasma gondii* não segue este padrão encontrado em seu filo. Embora os estágios sexuais do parasita sejam restritos aos enterócitos dos felinos, as formas assexuadas são capazes de invadir e desenvolver dentro de muitos tipos de células nas mais diferentes espécies de hospedeiros como os humanos, os animais domésticos, as aves, os marsupiais e os golfinhos (SMITH, 1995).

Descoberto em 1908 por Nicolle e Manceaux, o *T. gondii* pertence à classe sporozoasida, à subclasse coccidiasina e ordem eucoccidia, a mesma ordem de outros parasitas como *Isospora*, *Eimeria*, *Neospora* e *Sarcocystis* (WONG & REMINGTON, 1993; FORTES, 1997).

Existem dois aspectos distintos no ciclo de vida deste parasita: o ciclo de vida sexual que ocorre nos felinos (onde são encontrados os oocistos contendo esporozoítos) e o ciclo de vida assexuado que ocorre nos hospedeiros intermediários (onde são encontradas as formas taquizoíta e bradizoíta). O ciclo no gato inicia-se com a ingestão de cistos teciduais culminando, após várias etapas intermediárias, na produção de macro e microgametas no intestino do felino. A fusão dos gametas produz um zigoto que se desenvolve transformando-se em uma membrana cística rígida que é secretada como um oocisto não esporulado. Durante a infecção aguda um gato pode

excretar pelas fezes por volta de 100 milhões de parasitas por dia. Após 2 a 3 dias de exposição ao ar e à temperatura ambiente, o oocisto esporula e produz oito esporozoítos. Após a esporulação, os oocistos tornam-se altamente infecciosos e podem permanecer viáveis por muitos anos no solo. Eles podem ser acidentalmente ingeridos por humanos e outros animais. Após a ingestão e posterior digestão dos oocistos pelo pH ácido das secreções gástricas, os esporozoítos liberados infectam o epitélio intestinal do hospedeiro intermediário produzindo rapidamente as formas assexuadas taquizoítas e, em seguida, as bradizoítas. Os taquizoítas penetram nas células e começam a se multiplicar por endodiogenia. Quando o número de parasitas dentro da célula infectada está entre 64 e 128 (fenômeno observado *in vitro*) ocorre o rompimento dessas células e a liberação dos taquizoítas com posterior infecção de células adjacentes. Entre sete a dez dias após a infecção sistêmica, pelos taquizoítas, ocorre o desenvolvimento de cistos teciduais contendo bradizoítas. Esses cistos teciduais formam-se em vários órgãos dos hospedeiros, entretanto eles possuem um tropismo aumentado pelo sistema nervoso central e músculos (KASPER & BOOTHROYD, 1993).

Os humanos e outros animais podem se infectar principalmente através da via oral, como, por exemplo, através da ingestão de oocistos liberados pelos felinos no ambiente, ingestão de cistos encontrados em carne crua ou mal passada e ingestão de taquizoítas, bradizoítas ou oocistos em vegetais contaminados. Os humanos ainda podem se infectar pela transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidente laboratorial e pela transmissão congênita. Os felinos infectam-se geralmente através da ingestão de oocistos liberados por outros felinos ou de cistos encontrados na carne de outros animais. O primeiro relato de infecção humana foi documentado em 1923

(FORTES, 1997). Usualmente a infecção não é percebida em pessoas imunocompetentes, mas a infecção congênita do feto ou a infecção de pessoas imunocomprometidas (pacientes com câncer, transplantados e pacientes com AIDS) podem resultar em lesões debilitantes ou até mesmo levar à morte. Em pacientes com AIDS, *T. gondii* surge como um dos principais patógenos oportunistas, acometendo especialmente o sistema nervoso central. A encefalite toxoplásmica quase sempre ocorre devido a reativação de uma infecção crônica resultante de falha do sistema imunológico (WONG & REMINGTON, 1993).

O estudo da patogênese da infecção pelo *T. gondii* deve considerar os diversos fatores conhecidos que podem influenciar o padrão da resposta imune do hospedeiro frente ao parasita. Sabe-se, por exemplo, que o sexo e a presença de hormônios como o estrógeno podem ser decisivos no estabelecimento de um determinado tipo de resposta imune (KITAS & HENRY, 1980). Em camundongos SCID, os machos são mais resistentes que as fêmeas e essa resistência está associada com uma maior produção de IL-12 e IFN- γ , produzidos respectivamente por macrófagos e células "natural killer" (NK) (WALKER *et al*, 1997).

A linhagem de camundongo e a sua bagagem genética também podem conferir ou não resistência ao parasita. BROWN *et al* (1997) verificaram que camundongos que apresentam o gene L^d no cromossomo 17 (por exemplo, camundongos BALB/c) têm menores quantidades de cistos cerebrais e menor desenvolvimento de encefalite que aqueles que não apresentam o gene (por exemplo camundongos C57BL/10J).

Diferentes cepas de *T. gondii* apresentam graus diferentes de virulência. HOWE & SIBLEY (1995) analisaram 106 amostras do

parasita e determinaram a estrutura genética populacional do *T. gondii*, demonstrando a existência de três tipos clonais predominantes: tipo I, II e III. O primeiro grupamento de cepas está relacionado à toxoplasmose humana congênita e à virulência aguda em camundongos. O segundo grupamento relaciona-se aos casos de reativação da infecção crônica em humanos (intimamente ligado a AIDS) e o terceiro grupamento está associado às infecções animais. Segundo os autores, a definição destes três tipos de cepas pode prover uma poderosa combinação para o estudo dos genes que regulam a patogênese da toxoplasmose.

A via de infecção tem importante relevância no estudo da toxoplasmose. Um modelo de infecção toxoplásmica pela via oral é importante porque, durante a infecção natural, o parasita é usualmente adquirido pela ingestão de cistos encontrados na carne ou oocistos liberados pelos gatos. Grande parte das informações sobre a resposta imune e as informações histológicas sobre a presença do parasita nos tecidos do hospeiro murino está ainda intensamente baseada em modelos de animais infectados, com cistos ou taquizoítas, pela via intraperitoneal (McLEOD *et al*, 1984). Certas linhagens de camundongos possuem índice de mortalidade diferentes e lesões severas ou não dependendo da via de infecção. A linhagem C57BL/6 é comprovadamente mais susceptível à infecção pela via oral que pela via intraperitoneal quando infectados com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* (McLEOD *et al*, 1989).

A cepa Me-49 foi originalmente isolada da musculatura de carneiro. Ela é cistogênica e considerada avirulenta ou de baixa virulência (LUNDE & JACOBS, 1983). O principal critério para avaliar a virulência de uma cepa tem sido a porcentagem de mortalidade de camundongos e o tempo que esses animais levam para sucumbir

(FERGUSON & HUTCHISON, 1981). Em camundongos BALB/c a cepa ME-49 produz cistos que são particularmente evidentes no cérebro. O aparecimento de cistos caracteriza a fase crônica da infecção que persiste por toda a vida destes camundongos. Por outro lado, camundongos C57BL/6 infectados com a mesma cepa desenvolvem uma meningoencefalite progressiva com elevada taxa de mortalidade após 12 semanas de infecção (GAZZINELLI *et al*, 1993^a).

Outra cepa de *T. gondii*, a cepa RH, vem sendo intensamente utilizada como padrão na comparação entre cepas. A cepa RH foi isolada em 1939 de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmica (HOWE & SIBLEY, 1994). Quando injetada em camundongos alogênicos (SWISS) ou isogênicos (BALB/c e C57BL/6), a cepa RH leva-os à morte e por isso é considerada como sendo uma cepa virulenta ou altamente virulenta.

Os fatores que promovem a diferença existente na virulência das cepas estão sendo estudados. Antígenos específicos de cada cepa têm sido identificados (WARE & KASPER, 1987; KASPER, 1989; WOODISON & SMITH, 1990; SOETE *et al*, 1994). MAKIOKA & OHTOMO (1995), estudando a variação existente na virulência das cepas, constataram que a atividade da enzima DNA polimerase da cepa RH é significativamente maior que a da cepa ME-49, sugerindo uma possível correlação entre o aumento da atividade da enzima e uma maior taxa de divisão celular e multiplicação por parte da cepa virulenta. HOWE *et al* (1996) citam o locus SAG-1, no oitavo cromossomo do *T. gondii*, como o possível responsável pela regulação da virulência da cepas. O SAG-1 é um gene que codifica o principal antígeno de superfície dos taquizoítas, o antígeno SAG-1 (p30). Estudos sugerem que o SAG-1 participa na adesão e invasão das células hospedeiras pelos

taquizoítas (KASPER & MINEO, 1994; MINEO *et al*, 1993; MANGER *et al*, 1998; BOOTHROYD *et al*, 1998). Atualmente foi demonstrado que outra proteína de superfície do *T. gondii* pode estar relacionada com a adesão à célula do hospedeiro. Este antígeno, SAG-3 (p43), tem grande homologia com SAG-1 (TOMAVO, 1996).

Estudos relacionados com marcadores estágio-específicos têm confirmado a existência de uma molécula de 28 kDa associada ao citoplasma dos bradizoítas (WEISS *et al*, 1992; BOHNE *et al*, 1993^a) e quatro moléculas encontradas na superfície dos bradizoítas, com 18, 21, 34 e 36 kDa (TOMAVO *et al*, 1991; LANE *et al*, 1996). ZHANG & SMITH (1995), demonstraram a existência de uma molécula de 29 kDa que é predominantemente encontrada em frações solúveis de cistos intactos e bradizoítas.

ZINKERNAGEL *et al* (1997), propuseram que os antígenos sozinhos podem regular a resposta imune, dependendo de sua localização, dose (concentração) e tempo de permanência em que fica em contato com as células nos órgãos. Em camundongos CB6F1 a dependência da localização do antígeno ficou comprovada pelo do perfil de produção de citocinas, onde se observou um perfil Th1 (T "helper" 1) quando a infecção com *Leishmania major* foi feita nos coxins plantares dos animais e um perfil Th2 (T "helper" 2) quando os camundongos foram infectados na pele dorsal (NABORS *et al*, 1995). STEVENS *et al* (1996) descreveram que camundongos BALB/c vacinados oralmente tiveram uma resposta imune mediada por célula e uma imunidade protetora menos persistente à infecção por *Brucella abortus* 2308 que camundongos vacinados pela via intraperitoneal.

Pouco é conhecido sobre a influência da via de infecção nas possíveis diferenças que podem existir na resposta imune de linhagens

de camundongos resistentes às cepas avirulentas de *T. gondii*. A infecção de camundongos com essas cepas, pela via intraperitoneal, e as observações da variação da resposta imune encontradas a partir desta forma de infecção, estão sendo repensadas por não representarem mais precisamente os possíveis eventos imunológicos que podem ocorrer através da via natural de infecção, a via oral (BUZONI-GATEL *et al*, 1997; JOHNSON & SAYLES, 1997). Na infecção pela via oral existem eventos relevantes que podem ocorrer nos diferentes órgãos, intestinos e tecidos linfóides associados. CHARDÈS *et al* (1993) demonstraram que camundongos CBA/J e BALB/c são menos susceptíveis à toxoplasmose oral que os C57BL/6 e também demonstraram que camundongos CBA/J (altamente resistentes ao *T. gondii*) quando infectados oralmente têm uma resposta com perfil de citocinas predominantemente tipo Th2 nos linfonodos mesentéricos e Th1 no baço.

As células linfóides associadas com o trato gastrointestinal podem ser separadas em compartimentos: folículos linfóides (placa de Peyer), linfócitos da lâmina própria e linfócitos intraepiteliais (MOWAT & VINEY, 1997). BEAGLEY *et al* (1995) demonstraram que existem diferenças entre o fenótipo das células intestinais de camundongos BALB/c e C57BL/6. Os linfócitos intraepiteliais das duas linhagens são em sua maioria do tipo TCR⁺αβ no intestino grosso e TCR⁺γδ no intestino delgado. Entretanto, camundongos BALB/c apresentam maior proporção de células T CD8⁺ no intestino delgado e células T CD4⁺ no intestino grosso, o contrário do que ocorre nos intestinos de camundongos C57BL/6.

Em recente estudo ficou demonstrado que a transferência de linfócitos intraepiteliais primados protege camundongos CBA, BALB/c e C57BL/6 da infecção toxoplásmica. Após a transferência dos

linfócitos houve um significativo decréscimo do número de cistos encontrados nos cérebros de camundongos CBA e uma diminuição de 50% na mortalidade em BALB/c e C57BL/6. Esta proteção foi atribuída a produção de IFN- γ por linfócitos intraepiteliais CD8⁺ $\alpha\beta$ (BUZONIGATEL *et al*, 1997).

Após a infecção das células epiteliais do intestino, a sobrevivência do parasita irá depender do seu deslocamento para outros órgãos do hospedeiro, em particular, para as células do sistema nervoso central e as células musculares. Para facilitar o seu deslocamento o parasita pode encontrar um "meio de transporte" e os monócitos não aderentes são excelentes candidatos para isso. Quando circulantes, os monócitos podem ser infectados e dentro deles o parasita, opsonizado ou não, é hábil para sobreviver e se deslocar (FADUL *et al*, 1995). A dificuldade de se detectar parasitas no sangue, exceto por técnicas sensíveis baseadas no PCR, sugere que a distribuição inicial do parasita possa ser principalmente pela via linfática e dentro de poucos dias a uma semana após a infecção experimental em camundongos, taquizoítas podem ser encontrados no baço, placas de Peyer, pulmões, fígado e cérebro (SUMYUEN *et al*, 1995).

As infecções parasitárias são muitas vezes caracterizadas pela polarização das respostas das células T que podem ou não controlar o desenvolvimento da imunidade (MOLL, 1996). A polarização da produção de citocinas foi originalmente descrita entre os clones de células T CD4⁺ de camundongos: Th1 e Th2. Dentro desse conceito dicotômico de caracterização do padrão da produção de citocinas, ficou preconizado que um perfil Th1 é aquele em que células Th1 produzem predominantemente IFN- γ , IL-2 e linfotoxinas, enquanto que no perfil Th2, há a produção predominante de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-

13. Entretanto, várias outras proteínas são secretadas pelos dois tipos celulares, tais como: IL-3, TNF- α , GM-CSF e componentes da família das quimocinas. Embora existam respostas Th1 e Th2 bem documentadas, estas não são os únicos padrões possíveis de produção de citocinas, pois células T que expressam ambos os padrões tem sido chamadas de Th0 e células produtoras de grandes quantidades de TGF- β estão sendo chamadas de Th3 (MOSMANN & SAD, 1996).

Na toxoplasmose, várias citocinas têm sido descritas por conferir proteção a camundongos na fase aguda ou crônica da infecção. A IL-12 e o IFN- γ parecem ser citocinas essenciais para o desenvolvimento da imunidade protetora do tipo Th1 (GAZZINELLI *et al*, 1993^b; HUNTER *et al*, 1994; KHAN *et al*, 1994^a; HUNTER *et al*, 1995^a; SCHARTON-KERSTEN *et al*, 1996; GAZZINELLI *et al*, 1998). Entretanto, muitos trabalhos sugerem que a presença ou não de outras citocinas, tais como TNF- α (CHANG *et al*, 1990; PEETERMANS *et al*, 1995), TGF- β (HUNTER *et al*, 1995^b), IL-4 (VILLARD *et al*, 1995; SUZUKI *et al*, 1996; ROBERTS *et al*, 1996), IL-10 (BURKE *et al*, 1994; GAZZINELLI *et al*, 1996; NEYER *et al*, 1997), IL-1 β (HUNTER *et al*, 1995^c), IL-2 (HAQUE *et al*, 1994), IL-6 (DECKERT-SCHLUTER *et al*, 1995), IL-7 (KASPER *et al*, 1995), IL-15 (KHAN & KASPER, 1996) e a presença de reativos intermediários do nitrogênio (KHAN *et al*, 1996; HAYASHI *et al*, 1996; SCHARTON-KERSTEN *et al*, 1997) podem ser determinantes no desenvolvimento da imunidade e/ou da patologia no modelo murino.

A resposta imune celular na toxoplasmose é constituída por duas fases: uma resposta inicial inata e uma resposta, adaptativa, antígeno-específica. Durante a fase aguda da infecção as células NK

produzem IFN- γ independente do estímulo de células T e a síntese desta citocina parece ser essencialmente dependente de IL-12 (GAZZINELLI *et al*, 1993^b). Macrófagos expostos a produtos antigênicos de *T. gondii* liberam IL-12 que atua nas células NK. Após a exposição à IL-12, células NK produzem altos níveis de IFN- γ mesmo na ausência das células T. As monocinas IL-1 β e TNF- α potencializam os efeitos da IL-12 sobre as células NK e o IFN- γ produzido por estas células aumenta a síntese de IL-12 por macrófagos expostos aos produtos antigênicos do parasita (GAZZINELLI *et al*, 1998). Em camundongos imunocompetentes, o IFN- γ provavelmente sinergiza com TNF- α e ativa a ação microbicida dos macrófagos pela produção de reativos intermediários do nitrogênio (nitrito) durante o estágio inicial da infecção (KASPER & BUZONI-GATEL, 1998). Embora a síntese de óxido nítrico possa não ser essencial na elicitação da imunidade protetora do hospedeiro durante a infecção aguda (KHAN *et al*, 1996^a), ela parece ter um importante papel no controle da proliferação parasitária durante a infecção crônica (SCHARTON-KERSTEN *et al*, 1997).

Um recente estudo propõe um novo modelo para a imunidade frente às infecções microbianas. Com base nos seus achados, Reis e Souza *et al* (1997) propõe que as células dendríticas, e não os macrófagos, têm um papel chave como estimuladoras iniciais da resposta imune inata e influenciam posteriormente o tipo de resposta (Th1 ou Th2) das células T, na imunidade específica. Eles sugerem que no sítio da infecção, sinais locais estimulam a migração de células dendríticas que transportam antígenos microbianos para os tecidos linfóides. As células dendríticas são capazes de produzir IL-12, sem serem primadas, e

apresentar antígenos às células T, desencadeando o início da expansão clonal e a diferenciação de células T precursoras em células Th1 efectoras. Deste modo, as células dendríticas podem ativar as células NK pela produção de IL-12 e as células NK, produzindo IFN- γ , também podem predispor as células T precursoras a diferenciar-se.

Após alguns dias de infecção, o desenvolvimento de uma resposta imune pelas células T, específica ao parasita, torna-se essencial para a proteção do hospedeiro. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ atuam sinergicamente e são essenciais no desenvolvimento e manutenção da imunidade. Enquanto as células T CD4⁺ são importantes para montar e manter a resposta específica frente ao *T. gondii*, as células T CD8⁺ são críticas para a sobrevivência do hospedeiro, principalmente pela produção de IFN- γ (KHAN *et al*, 1994^b). Evidências sugerem que, na fase crônica da infecção, o IFN- γ pode prevenir a ruptura dos cistos teciduais e a neutralização de IFN- γ , "in vivo", induz a reativação toxoplásmica exacerbando a encefalite (SUZUKI *et al*, 1989). Estudos propõe ainda que o IFN- γ induz os taquizoítas a expressarem antígenos de bradizoítas, sugerindo sua participação no encistamento do parasita (BOHNE *et al*, 1993).

Durante a infecção por *T. gondii* existe uma seleção com relação ao tipo celular que irá preponderar sobre outro, ou seja, Th1 ou Th2. A estimulação das células T precursoras pelas células apresentadoras de antígeno (como as células dendríticas, por exemplo) induz a síntese de IL-2 pelas células T, provocando proliferação destas células e o início da diferenciação das mesmas em células efectoras. A exposição de células T precursoras e de células Th0 à IL-12 favorece a diferenciação para um fenótipo Th1 e o desenvolvimento da imunidade

mediada por células. Por outro lado, a exposição dessas células à IL-4, favorece a diferenciação para um perfil predominantemente Th2 que inibe o desenvolvimento de um perfil Th1 (GAZZINELLI *et al*, 1998).

Sabe-se que tanto o IFN- γ como a IL-4 possuem um efeito potente na proliferação e diferenciação de células B. O IFN- γ estimula a expressão de imunoglobulinas do isotipo IgG2a e inibe a produção de IgG3, IgG1, IgG2b e IgE. Por outro lado, a IL-4 tem um poderoso efeito no estímulo da expressão de IgG1 e IgE e inibe marcadamente a produção de IgM, IgG3, IgG2a e IgG2b. A capacidade do IFN- γ de estimular a produção de IgG2a é particularmente interessante em relação a sua capacidade de aumentar a expressão de receptores FcR1 específicos para esta imunoglobulina. O anticorpo IgG2a é o isotipo mais efetivo na indução de citotoxicidade celular dependente de anticorpo desenvolvida por macrófagos e células NK (sobre células tumorais), enquanto que a IgG1 tem reduzida atividade de indução dessa citotoxicidade. Ainda o subtipo IgG2a tem marcante superioridade na atividade de fixação de complemento que o subtipo IgG1. Esses achados sugerem que o IFN- γ , estimulando a produção de IgG2a, pode ter um importante papel em eventos como a citotoxicidade celular dependente de anticorpo, opsonização e lise mediada pelo complemento (SNAPPER & PAUL, 1987). MINEO *et al* (1993) demonstraram que camundongos, infectados pela via oral, produzem IgA secretória para o antígeno p30. Esses autores sugerem que, como esta imunoglobulina é produzida no intestino murino, bem como no soro na forma de IgA monomérica, talvez seja possível que anticorpos para esse epitopo (p30) possam reduzir ou prevenir a infecção das células através da utilização de protocolos que venham empregar vacinas orais.

Embora a existência da dicotomia Th1/Th2 permaneça sendo enfatizada como responsável por importantes atividades funcionais efetoras do sistema imune (MOSMANN & SAD, 1996), é prudente não afirmar qual dos perfis é protetor ou não, pois sabe-se hoje que ambas populações celulares e suas citocinas participam conjuntamente de mecanismos regulatórios. GAZZINELLI *et al* (1996) verificaram que camundongos "knock-out" para IL-10 morrem provavelmente pela exacerbação da resposta imune celular tipo Th1 durante a infecção aguda. Outro estudo utilizando camundongos "knock-out" para IL-4 também demonstrou resultados semelhantes aos encontrados em camundongos depletados de IL-10, supondo que estas citocinas podem modular a resposta imune, evitando a exacerbação de atividades potencialmente prejudiciais das mesmas (ROBERTS *et al*, 1996). Recentemente, foi observado que a neutralização do IFN- γ , "in vitro" e "in vivo", reverte a supressão da resposta proliferativa a mitógeno durante a fase aguda da infecção. Isto indica que esta citocina, apesar de seu marcante efeito protetor, também é um possível fator imunossupressor (CANDOLFI *et al*, 1994). O mesmo efeito imunossupressor também foi descrito por HUNTER *et al* (1995^a) em relação a IL-12.

Em camundongos SCID, a IL-12 é importante na regulação da resistência frente ao *T. gondii*. O efeito protetor da IL-12 nestes animais parece vir da atividade de células NK produtoras de IFN- γ (HUNTER *et al*, 1994). Estudando a resposta imune em camundongos BALB/c (imunocompetentes), HUNTER *et al* (1995^a) verificaram que a administração de IL-12 em camundongos infectados, pela via intraperitoneal, com a cepa C56 (virulenta) de *T. gondii*, aumentou o período de sobrevivência e que este efeito foi abolido pela administração

de anticorpos anti-IFN- γ ou anti-TNF- α e pela depleção de células NK. Eles ainda verificaram que, quando os camundongos eram infectados pela via oral com a cepa ME-49 e recebiam anticorpos anti-IL-12 resultava em 100% de mortalidade acompanhada de diminuição dos níveis de IFN- γ no soro.

Que padrão de resposta imune seria obtido, no modelo citado acima e em outros modelos que estudam a toxoplasmose, se vias diferentes de infecção fossem testadas em experimentos paralelos? O que estaria acontecendo no organismo de hospedeiros, imunocompetentes e resistentes a determinadas cepas, se a mesma cepa de *T. gondii* fosse administrada por vias consideradas mais naturais ou não? A via de infecção pode influenciar o perfil imunológico destes hospedeiros?

2 - OBJETIVOS

Baseando-se nas inúmeras questões descritas anteriormente, o presente trabalho teve por objetivo:

- 1- Avaliar se a via de infecção pode alterar o perfil da resposta imune em camundongos imunocompetentes e resistentes à cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*.
- 2- Descrever o perfil da resposta imune encontrada nestes camundongos durante a fase aguda da infecção.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com idade de 6 a 8 semanas no início dos experimentos. As matrizes desses camundongos foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. João Santana da Silva (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo). As matrizes e suas crias foram então mantidas no biotério do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2 - Parasitas

As cepas RH e Me-49 de *Toxoplasma gondii* foram mantidas no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia. A cepa RH é mantida pela passagem de taquizoítas na cavidade peritoneal de camundongos alogênicos. Após a lavagem peritoneal com 4 ml de PBS estéril (0,01M; pH 7.2), os parasitas são injetados em outros animais, sequencialmente, a cada 48 horas.

A cepa ME-49 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ricardo T. Gazzinelli (Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais) e foi mantida no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia desde dezembro de 1996. Esta cepa é mantida na forma de cistos cerebrais de camundongos

infectados cronicamente. Os cérebros desses animais foram macerados em 5 ml de PBS estéril, passados em seringa de vidro sem e com agulha (25x7 ou 22 g 1, SR Produtos Hospitalares, Manaus, Brasil) para fragmentação do tecido. O macerado foi lavado em PBS estéril por centrifugação a 1000 g por 10 minutos e ressuspenso em PBS estéril. Os cistos foram contados de acordo com a técnica descrita anteriormente por BROWN *et al* (1995), com algumas modificações. A contagem foi feita colocando-se uma alíquota de 50 µl da solução contendo cistos entre lâmina e lamínula (24x60 mm, Glass Técnica, São Paulo, Brasil) e observando-se ao microscópio óptico, contando-se o campo inteiro, em aumento de 10 vezes.

3.3 - Preparação do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* (STA)

O antígeno foi preparado conforme a técnica descrita por SCOTT *et al* (1987), com algumas modificações. Taquizoítas da cepa RH foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos usando-se PBS estéril. A solução contendo os parasitas foi centrifugada a 1000 g por 10 minutos a 4°C. A concentração de parasita foi ajustada de modo a conter $1,2 \times 10^9$ parasitas/ml em uma solução de PBS estéril acrescida de 50 µg/ml de leupeptina (Sigma, St. Louis, USA) e 1,6 mM de fluoreto fenil-metil-sulfonil - PMSF (Sigma). Após esta etapa, a suspensão foi incubada em banho de gelo por 10 minutos. Os parasitas foram, então, lisados por sonicação com 3 pulsos de 30 segundos em um disruptor de

células THORNTON (Inpec Eletrônica S/A, Vinhedo, Brasil). O lisado foi centrifugado a 10000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante então foi coletado, filtrado em membrana com poro de 0,22 µm (Millipore, Bedford, USA) e a concentração proteica determinada utilizando-se o método de LOWRY *et al* (1951) empregando-se como padrão soro albumina bovina (Sigma).

3.4 - Análise eletroforética do STA

O antígeno STA foi avaliado quanto ao perfil proteico por eletroforese (LKB Bromma 2301, Suécia) em gel de poliacrilamida a 12%, contendo dodecil sulfato de sódio a 0,1% (SDS-PAGE) conforme descrito por LAEMMLI (1970). As proteínas na amostra foram visualizadas pelo corante de Ponceau e comparadas aos padrões de peso molecular das proteínas miosina (200 kDa), fosforilase B (112 kDa), soro albumina bovina (68 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), β-lactoglobulina (18 kDa) e lisozima (14 kDa) (Gibco BRL, Gaithersburg, USA).

3.5 - Análise da sobrevivência de camundongos BALB/c

Grupos de camundongos BALB/c, contendo 15 camundongos por grupo, foram infectados pela via oral ou pela via intraperitoneal (IP). Para a infecção oral foi utilizada uma agulha (40x12) adaptada, com ponta romba, como sonda gástrica. Os diferentes grupos foram infectados com 20, 80, 100 e 200 cistos por animal. Nesse estudo os camundongos foram observados por até 30 dias após a infecção.

3.6 - Infecção dos camundongos e coleta de sangue

Grupos de camundongos, com sorologia prévia negativa para *T. gondii*, foram infectados com 20 cistos da cepa ME-49 (0,5 ml/animal) pelas vias oral e ip e foram sacrificados nos dias 3, 12 e 21 após a infecção. Um total de 12 animais infectados foi utilizado para cada dia, sendo 6 infectados pela via oral e outros 6 pela via ip. Animais controles receberam, pelas mesmas vias, suspensões de cérebros de animais não infectados macerados em PBS estéril. Nos dias de sacrifício foi feita punção retrorbital dos camundongos e os soros foram estocados para os ensaios de detecção de imunoglobulinas.

3.7 - Análise da reatividade de soros anti-*Toxoplasma gondii*

3.7.1 - Detecção e titulação de anticorpos gamaglobulínicos totais anti-*Toxoplasma gondii*.

Placas de poliestireno (Corning, New York, USA) de 96 orifícios foram incubadas por 18 horas a 4°C com 50 µl por orifício contendo 10 µg/ml de STA diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% e receberam as amostras de soros testes (em duplicata) diluídos em PBS-T 0,05%. Para a detecção de anticorpos, soros foram diluídos a 1:50 e para a titulação, as amostras de soros de quatro camundongos escolhidos aleatoriamente, um de cada grupo com sorologia comprovadamente positiva, foram diluídos a partir de 1:50, na razão 2, até a sétima diluição. Após a incubação das amostras de soros por 45 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T 0,05% e receberam o conjugado enzimático (50 µl/poço - IgG de coelho anti gamaglobulina de camundongo marcada com peroxidase) diluído em PBS-T 0,05% na razão de 1:2000. Após nova incubação por 45 minutos a 37°C, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T 0,05% e a reatividade foi revelada pela adição de 50 µl por orifício de substrato enzimático constituído de orto-fenilenodiamina (OPD, Sigma), diluído em tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 5,5), e água oxigenada 30 %. Após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N e a leitura efetuada a 492 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, MkII, Finlândia).

O cálculo do "cut-off" foi feito pela soma da média dos padrões negativos com o resultado da multiplicação por três do desvio padrão, dessa mesma média.

3.7.2 - Detecção de anticorpos IgA anti-*Toxoplasma gondii* pelo método de ELISA

Placas de poliestireno (Corning) de 96 orifícios foram sensibilizadas com antígeno STA conforme descrito anteriormente. Em seguida as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% e receberam as amostras de soros testes (em duplicata) diluídos em PBS-T 0,05% na razão 1:50. Após a incubação das amostras de soros por 45 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas e receberam em cada orifício 50 µl de soro de coelho (diluído a 1:100) contendo anticorpos anti-IgA de camundongos (Bio-Rad, Richmond, USA). Depois de incubadas novamente por 45 minutos a 37°C, as placas foram lavadas e receberam em cada orifício 50 µl de soro de cabra (diluído a 1:20000; Sigma) contendo anticorpos (anti-gamaglobulinas de coelho) marcados com peroxidase. Terminado o tempo de incubação de 45 minutos a 37°C, as placas foram lavadas e a atividade enzimática e a leitura feitas conforme descrito anteriormente.

3.7.3 - Detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Toxoplasma gondii*

Placas de poliestireno (Corning) de 96 orifícios foram sensibilizadas com STA e incubadas conforme descrito anteriormente. Após serem lavadas por 3 vezes com PBS-T 0,05%, foi adicionado a cada orifício 50 µl de amostras de soros testes (em duplicata) diluídos em PBS-T 0,05%, na razão 1:50. Após incubação por 1 hora a 37°C e lavagem das placas com PBS-T 0,05%, foram adicionados 50 µl por orifício de soros de coelho contendo anticorpos anti-IgG2a e IgG1 de camundongo (diluído a 1:100). Depois de novamente incubadas e lavadas como descrito acima, as placas receberam 50 µl de soro de cabra (diluído a 1:4000; Biorad) contendo anticorpos (anti gamaglobulinas de coelho) marcados com peroxidase. Terminado o tempo de incubação de 45 minutos a 37°C, as placas foram lavadas e a atividade enzimática e a leitura feitas conforme descrito anteriormente.

3.7.4 - "Western-blot"

Após a migração das proteínas de STA em gel de poliacrilamida a 12%, realizou-se a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (Sigma) com 0,45 µm de porosidade. Em resumo, folhas de papel de filtro, nitrocelulose (NC) e gel contendo as proteínas foram embebidas em tampão de transferência [Tris a 25 mM (Sigma), glicina a 192 mM (Sigma) e metanol a 20% (Merck)]. Foi

montado um "sandwich" na seguinte sequência: papel de filtro, NC, gel, papel de filtro. Esta preparação foi, então, colocada em cuba de transferência (LKB Bromma 2117 Multiphor II - Eletrophoresis Unit, Suécia) com as placas de grafite umidificadas. Foi estabelecido como condições para transferência uma de corrente 101 mA/cm^2 , a $0,8 \text{ V}$, durante 2 horas. As tiras de NC contendo as proteínas foram bloqueadas com PBS-T 0,05%-M por duas horas a temperatura ambiente, sob agitação lenta horizontal. Após o bloqueio, foram adicionados $500 \mu\text{l}$ de amostras de soros dos camundongos infectados, dos camundongos não infectados e de amostras de soros de camundongos controles infectados (padrões positivos) diluídas na razão 1:50 em PBS-T 0,05%-M. Soro de camundongo infectado com a cepa RH, também utilizado como padrão positivo, foi diluído na razão 1:1000. Depois de incubadas por uma noite a 4°C , as tiras de NC receberam o conjugado imunoenzimático (IgG de cabra anti- imunoglobulinas de camundongo ligada à peroxidase) na diluição de 1:2000. Foi feita incubação por 2 horas, sob agitação horizontal lenta. A revelação da reatividade foi efetuada pela adição de solução de PBS contendo diaminobenzidina (DAB, Sigma) e peridrol 30% (Merck). A reação foi interrompida após cinco minutos por lavagens sucessivas em água corrente.

3.8 - Coleta de órgãos

Após as sangrias os animais foram anestesiados em éter, mortos por deslocamento cervical e os seus baços, linfonodos mesentéricos e linfonodos poplíteos coletados. Em cada dia de sacrifício foi realizada também a coleta de cérebros para a verificação da presença ou não de cistos. Todos os órgãos foram observados quanto a alteração de sua morfologia e os que se apresentaram hiperplásicos foram medidos com paquímetro e comparados aos órgãos dos animais controles. Os órgãos foram rapidamente coletados e mantidos em meio de cultura gelado (MEM, Sigma).

3.9 - Cultura de células

Os órgãos foram divulsionados em meio de cultura (MEM, Sigma) acrescido de 100 µg de estreptomicina/ml, 100 U de penicilina/ml, 10 µg de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células dos linfonodos e do baço foram centrifugadas uma vez em 5 ml de meio de cultura a 250 x g a 4°C por 10 minutos. Em seguida somente as células esplênicas foram depletadas de hemácias pela adição de 2 ml de tampão de lise (pH 7,2) composto de NH_4CL (0,15 M), KHCO_3 (1 mM), Na_2EDTA (0,1 M). Fez-se, então, outra centrifugação em 5 ml de meio de cultura a 250 g a 4°C por 10 minutos. As células esplênicas foram diluídas na razão de 1/100 e as células dos linfonodos na razão de 1/1 em azul de Trypan (Sigma). Foi feita a contagem em

câmara de Neubauer e a concentração de celular foi ajustada de modo a conter 2×10^6 células/ml em placas de 48 orifícios (Costar, Cambridge, USA). O plaqueamento foi feito em duplicatas onde cada poço recebeu um volume final de 1 ml. As células foram cultivadas por 48 horas em estufa umidificada contendo ar mais 5% de CO₂, na presença ou não de STA (10 µg/ml), Con-A (2 µg/ml) ou meio de cultura, apenas. Por fim, os sobrenadantes da cultura foram coletados e utilizados para as dosagens de citocinas.

3.10 - Dosagem de citocinas e do Óxido Nítrico (Nitrito)

As citocinas IFN- γ , IL-4, IL10 e IL-12 (p40) foram dosadas por ELISA (método de "sandwich"). As concentrações de cada citocina nos sobrenadantes foram calculadas utilizando-se a curva de regressão linear a partir de curva padrão realizada para as respectivas citocinas. As citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12 e o nitrito foram dosados no Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, com o espaço de trabalho e todos os anticorpos utilizados sendo gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo T. Gazzinelli.

3.10.1 - Dosagem de IFN- γ

Placas de poliestireno de alta afinidade (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram incubadas por 18 horas a 4°C com 100 μ l por orifício contendo 3,5 μ g/ml de anticorpo monoclonal IgG1 de rato (Genzyme, Cambridge, USA) anti IFN- γ , diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6. Em seguida as placas foram bloqueadas com solução de soro fetal bovino a 10% em PBS (PBS-SFB 10%), por uma hora a 37°C. Após o bloqueio, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (Sigma) a 0,05% (PBS-T 0,05%) e, então, adicionadas diferentes concentrações de IFN- γ murino recombinante (Genetech), a partir de 100 ng/ml até a 11ª diluição na razão dois. As amostras testes foram adicionadas puras (100 μ l/orifício). As placas ficaram incubando por uma noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T 0,05% e o anticorpo policlonal anti-IFN- γ , produzido em coelho, foi adicionado na diluição 1:1000 (100 μ l/orifício), em PBS-SFB 10%. As placas foram incubadas a 37°C por uma hora e lavadas novamente por 4 vezes. Foi, então, adicionado 100 μ l/orifício, o conjugado imunoenzimático IgG de burro anti-IgG de coelho ligada à peroxidase na diluição 1:2000 em PBS-SFB 10%. Após 30 minutos de incubação a 37°C, as placas foram novamente lavadas por 4 vezes e a reatividade revelada pela adição de ABTS e H₂O₂ nos orifícios. Após 30 minutos de incubação a 37°C a leitura foi efetuada a 405 nm em fotocolorímetro (Stat Fax 2100 - Awareness Technology).

3.10.2 - Dosagem de IL-12 p40

Brevemente, placas de alta afinidade (Nunc) tiveram seus orifícios recobertos com 100 µl do anticorpo monoclonal C1517 diluído a 1:750 e foram incubadas a 4°C por 18 horas. Em seguida, as placas foram lavadas e bloqueadas como descrito anteriormente. Novamente repetiu-se a série de lavadas e a curva padrão foi adicionada a partir de 50 ng/ml até a 11ª diluição (na razão dois), em meio com 10% de SFB; as amostras testes foram adicionadas puras (50 µl/orifício). As placas ficaram incubando por 18 horas a 4°C e foram lavadas novamente. Após este período foi adicionado o anticorpo monoclonal C15-6-7 biotinilado diluído 1:500 em PBS-SFB 5% e incubado por 1 hora a 37°C. Ao final da incubação, as placas foram lavadas e foram adicionados 100 µl do complexo estreptoavidina-peroxidase na diluição 1:1000 em PBS-SFB 5%. As placas foram incubadas, lavadas e a reatividade foi determinada conforme descrito anteriormente.

3.10.3 - Dosagem de IL-10

A dosagem de IL-10 foi realizada de acordo com os protocolos anteriormente descritos. Foi utilizado um anticorpo anti-IL-10 (Pharmingen, San Diego, USA) diluído 1:250. A curva padrão com anticorpo recombinante murino anti-IL-10 iniciou com 20 ng e foi até a 11ª diluição na razão dois. As amostras testes foram adicionadas puras (50 µl/orifício). O anticorpo biotinilado anti-IL-10 de camundongo foi

utilizado como anticorpo secundário, diluído 1:250 em PBS-SFB 10%. A análise da reatividade procedeu conforme descrito para as outras citocinas.

3.10.4 - Dosagem de IL-4

A citocina IL-4 foi dosada conforme os protocolos descritos anteriormente, tendo como anticorpo monoclonal imobilizado anti-IL-4 (BVD6) na concentração de 10 µg/ml em tampão carbonato. A curva padrão (rMu-IL-4) iniciou com 10 ng e foi até a 11^a diluição na razão dois. As amostras foram colocadas puras. Como segundo anticorpo, foi utilizado anti-IL-4 biotinilado, obtido do hibridoma 11B11, na diluição de 1:5000 em PBS-M 5%. Os procedimentos subsequentes foram utilizados de acordo com os protocolos anteriores

3.10.5 - Dosagem do Óxido Nítrico (Nitrito)

A produção de óxido nítrico foi avaliada medindo-se o acúmulo de nitrito nos sobrenadantes de cultura pela reação colorimétrica de Griess, conforme modificações no protocolo descrito previamente por DING *et al* (1988). Em resumo, 100 µl de sobrenadante foi adicionado a uma mistura de 50 µl de sulfanilamida a 1% (em H₃PO₄ 2,5%) e 50 µl de N-(1-naftil) etileno-diamino dihidroclorido a 0,1% (em

H₃PO₄ 2,5%). A absorbância foi lida após 5 minutos em espectrofotômetro a 550 nm e comparada a uma curva padrão de uma solução de nitrito feita em meio RPMI-1640 (Sigma), a partir de 500 µM indo até a 11^a diluição, na razão dois.

3.11 - Análise Estatística

Para a comparação dos níveis de produção de imunoglobulinas séricas e citocinas, foi utilizado o teste *t* de Student, com análise de amostras não pareadas. Para este método foi utilizado o "software" Graph Pad Instat TM (1990-1993) V2.02. Para testar as hipóteses elaboradas em cada caso, utilizou-se como probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade H₀, o valor fixo $p < 0,05$. Os resultados estatisticamente significantes foram representados nas figuras por asterisco (*).

4 - RESULTADOS

4.1 - Análise da sobrevivência de camundongos BALB/c.

Esse experimento foi realizado para verificar se diferentes vias de infecção poderiam provocar a morte dos animais. Para tanto, diferentes grupos de camundongos (n=15) foram infectados, pela via oral ou pela via intraperitoneal (IP), com 20, 80, 100 e 200 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Todos os grupos desenvolveram sinais característicos da infecção (caquexia, letargia, pêlos arrepiados, olhos semi-cerrados, fezes ressecadas e escurecidas) entre os dias 7 e 12 pós-infecção, período em que foi observada a morte de um animal do grupo infectado com 100 cistos (IP), um animal do grupo 200 cistos (oral) e dois do grupo 200 cistos (IP) (Fig.1). Nesse estudo os animais foram observados por um período de até 30 dias e, então, foram sacrificados para coleta de cistos cerebrais para outros ensaios, comprovando a infecção pela presença do parasita encistado. McLeod *et al* (1984) citam que a cepa ME-49 é avirulenta, para fêmeas de camundongos BALB/c, quando uma concentração menor ou igual a 260 cistos é administrada pela via oral.

Ficou demonstrado que camundongos, infectados com 20 cistos conseguem sobreviver. Isto prova que, com essa concentração de cistos, a cepa ME-49 não mata os animais, por nenhuma das citadas vias de infecção. Os resultados obtidos são representativos de um dos três diferentes experimentos realizados com camundongos da linhagem BALB/c.

Os baços e linfonodos de camundongos, coletados durante este trabalho, foram analisados quanto a alteração de suas morfologias e

aqueles, considerados hiperplásicos por análise visual, foram medidos e comparados aos órgãos dos camundongos controles. É interessante destacar que somente os baços de camundongos infectados, pela via oral, apresentaram-se aumentados de tamanho nos dias 12 e 21 pós-infecção.

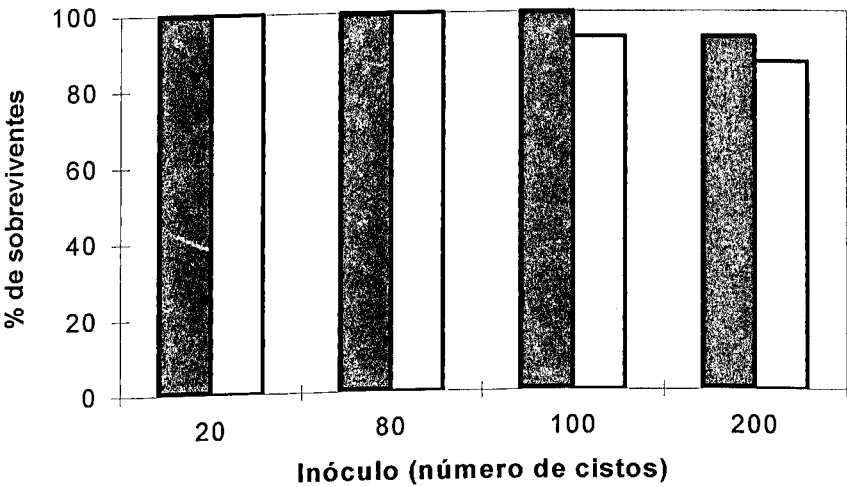


Figura 1- Análise da sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com a cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*. Camundongos BALB/c infectados, pelas via oral (■) e intraperitoneal (□), com 20, 80, 100 e 200 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Cada grupo de animal, composto por 15 animais cada, foi observado por até 30 dias.

4.2 - Detecção de anticorpos gamaglobulínicos totais anti-*Toxoplasma gondii*

Após verificar que camundongos BALB/c, infectados com 20 cistos, conseguem sobreviver à infecção, independente da via utilizada, foi feita análise sorológica para saber se uma mudança da via de infecção poderia induzir variação na produção de imunoglobulinas em diferentes tempos de parasitismo (Fig.2).

Os animais infectados por 3 dias não produziram níveis significantes de imunoglobulinas totais quando comparados aos animais não infectados ($p = 0,7693$). Dentro de cada grupo, a produção de imunoglobulinas foi maior em camundongos infectados por 12 dias pela via ip ($p < 0,020$) e significativamente aumentada em camundongos infectados por 21 dias pela via oral ($p < 0,012$).

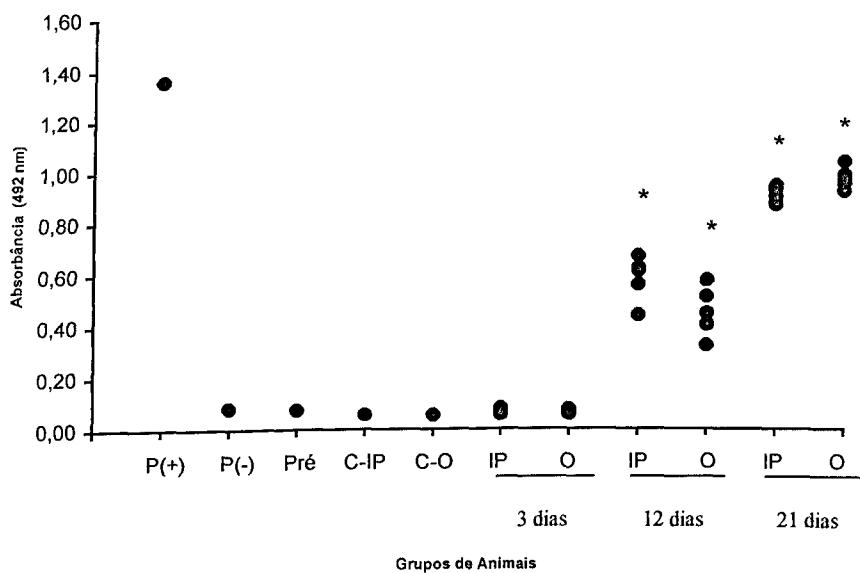


Figura 2 - **Detecção de anticorpos gamaglobulínicos totais anti *T. gondii* pelo método de ELISA em amostras de soros.** Camundongos BALB/c foram infectados com 20 cistos da cepa ME-49 pelas vias oral (O) e intraperitoneal (IP), sendo sacrificados nos dias 3, 12 e 21 pós infecção. Um total de 12 animais foi utilizado em cada dia, com 6 animais infectados para cada via. Grupos controles (quatro animais por grupo) receberam, pelas mesmas vias (C-IP e C-O), suspensão de cérebros de animais não infectados. P(+), padrão positivo; P(-), padrão negativo; Pré, sangria prévia.

4.3 - Análise dos anticorpos anti-*T. gondii* por "Western-blot"

As amostras de soros positivas ou não, pela técnica de ELISA, foram novamente analisadas por "Western-blot" definindo a ligação de diferentes populações de anticorpos séricos com proteínas parasitárias de diferentes pesos moleculares (Fig.3). Os anticorpos, de animais infectados com a cepa ME-49, ligaram-se predominantemente às proteínas antigênicas, de taquizoítas da cepa RH, com pesos de 42 e 31 kDa. Interessantemente, anticorpos contra uma proteína de peso molecular próximo de 125 kDa não foram detectados no 12º dia nas amostras de soros de animais infectados pela via oral, mas começaram a aparecer, nesse mesmo tempo de infecção, em animais infectados pela via intraperitoneal. O mesmo aconteceu com outra proteína de peso aproximado de 63 kDa. Marcações através de bandas apareceram nas amostras de soros de todos os animais infectados pelas diferentes vias, após 21 dias de infecção. As amostras de soros utilizadas como padrão positivo, mostraram que os anticorpos séricos de camundongos infectados com as cepas ME-49 e RH compartilham a maioria dos epítomos e ligam-se a uma proteína comum com peso molecular de 31 kDa. Esses resultados mostram que, o antígeno solúvel de taquizoíta da cepa RH, utilizado na cultura de células de camundongos infectados pela cepa ME-49, possui epítomos que podem induzir a resposta imune celular, validando o sistema heterólogo utilizado. O "Western-blot" confirma os resultados do teste de ELISA demonstrando a não produção de imunoglobulinas no terceiro dia de infecção.

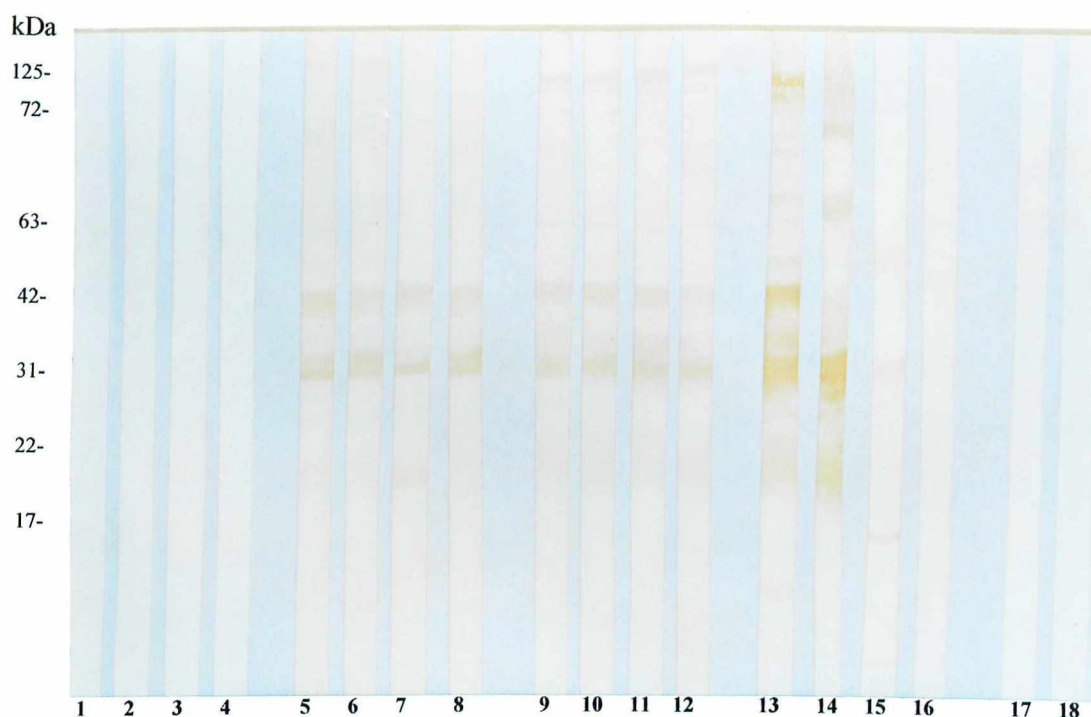


Figura 3 - Análise dos anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soros pela técnica de "Western-blot". Pistas 1 a 4, amostras de soros de animais com 3 dias de infecção (1-2 = IP; 3-4 = oral); pistas 5 a 8, amostras de soros de animais com 12 dias de infecção (5-6 = IP; 7-8 = oral); pistas 9 a 12, amostras de soros de animais com 21 dias de infecção (9-10 = IP; 11-12 = oral); pistas 13 a 16, amostras de soros padrão (13 = ME-49; 14 = RH; 15 = PJA; 16 = negativo); pistas 17 e 18 amostras de soros controle (17 = IP; 18 = Oral).

4.4 - Determinação dos níveis de anticorpos gamaglobulínicos totais anti-*T. gondii*

Camundongos BALB/c, infectados com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, produzem imunoglobulinas após 12 e 21 dias, independente da via de infecção, conforme demonstrado anteriormente. Para a determinação dos títulos dos anticorpos foram utilizadas amostras de soros de quatro animais tomados aleatoriamente, ou seja, de todos os grupos citados, tomou-se um animal com 12 dias de infecção (via oral), outro com 12 dias (via IP), um animal com 21 dias de infecção (via oral) e outro com 21 dias (via IP), todos escolhidos ao acaso. Os títulos de anticorpos dos soros foram verificados pelo método de ELISA a partir da diluição 1:50 até 1:3200, sendo o fator de diluição igual a dois (Fig. 4). A titulação sorológica foi realizada em apenas quatro animais, representantes de cada grupo, devido a semelhança do perfil dos anticorpos gamaglobulina total séricos encontrados em todos os grupos, conforme demonstrado na Fig.2. Esse resultado sugere que animais infectados por mais tempo (21 dias) têm níveis mais elevados de anticorpos e que ambas as vias de infecção induzem uma concentração sérica semelhante de imunoglobulinas. O "cut-off" encontrado nessa reação foi igual a 0,29.

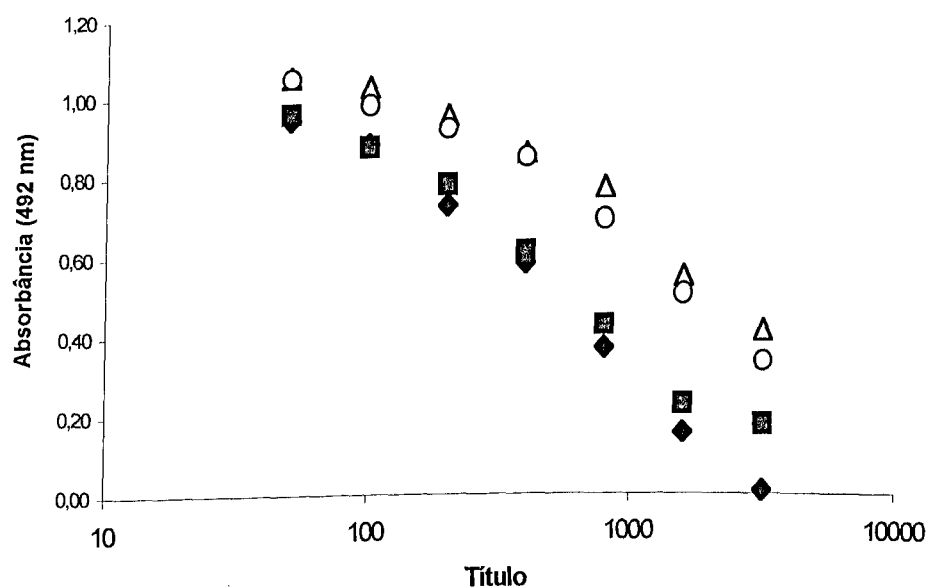


Figura 4 - **Determinação dos títulos de anticorpos gamaglobulínicos totais avaliados pelo método de ELISA.** Camundongos BALB/c infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* por 12 dias (oral ■, IP ♦) ou 21 dias (oral △, IP ○) tiveram seus soros analisados quanto a concentração de imunoglobulinas totais. Cada ponto corresponde a titulação do soro de um animal escolhido aleatoriamente dos grupos oral e intraperitoneal, comprovadamente infectados por 12 e 21 dias.

4.5 - Isotipagem de anticorpos

As amostras de soros dos animais infectados, analisados pelo método de ELISA na detecção de anticorpos gamaglobulina total anti *T. gondii*, foram também analisadas quanto a presença ou não de IgA, IgG1 e IgG2a pelo mesmo método. Nesse experimento, foram isotipados somente as amostras de soros de camundongos infectados por 12 e 21 dias. Conforme demonstrado anteriormente, camundongos infectados por três dias mostraram não possuir níveis detectáveis de imunoglobulinas totais e por isso não foram considerados nesse estudo.

4.5.1 - Detecção de anticorpos IgA

Esta abordagem sorológica apresentou um "cut-off" igual a 0,20 e mostra que, quando comparados aos controles, animais infectados pela via IP produziram, IgA após 12 dias de infecção ($p = 0,012$), diferentemente dos animais infectados, pelo mesmo tempo, pela via oral ($p = 0,24$). Após 21 dias, os animais infectados pela via oral, produzem os mesmos níveis de IgA que os do grupo IP correspondente ($p = 0,08$). A via IP induz uma produção mais rápida de IgA sérica que não aumenta no 21º dia de infecção ($IP_{12} \times IP_{21}$, $p = 0,11$). Por outro lado, animais infectados pela via oral não possuem IgA sérica no 12º dia de infecção e possuem no 21º dia ($O_{12} \times O_{21}$, $p = 0,0001$), mostrando uma significativa produção tardia desta imunoglobulina (Fig.5).

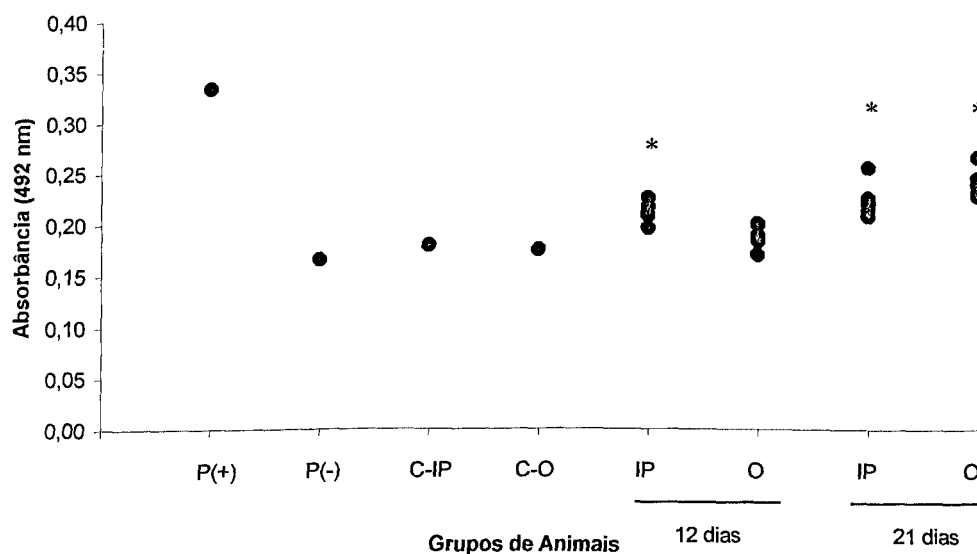


Figura 5 - Detecção de anticorpos IgA pelo método ELISA. Camundongos BALB/c foram infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* pelas vias oral (O) e intraperitoneal (IP), e sangrados em diferentes dias de infecção para detecção sérica de imunoglobulina do sorotipo IgA. Cada grupo de camundongos era composto de 12 animais, sendo 6 para cada via de infecção. Camundongos controle (C-IP e C-O) receberam suspensão de cérebros de animais não infectados. P(+), padrão positivo; P(-), padrão negativo.

4.5.2 - Detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a

Animais com diferentes dias de infecção (12 e 21 dias) foram sangrados e as amostras de soros utilizadas para a detecção de anticorpos dos isotipos IgG1 e IgG2a.

Animais infectados pela via IP produziram IgG1 no 12º dia de infecção, mostrando um aumento da mesma no 21º dia ($IP_{12} \times IP_{21}$, $p = 0,005$). Os animais infectados por 12 dias, via oral, não produziram IgG1 em níveis detectáveis quando comparados aos animais dos grupos controle ($p = 0,0676$). Por outro lado, animais também infectados pela via oral, por 21 dias, tiveram maior produção de IgG1 quando comparados aos animais infectados pela via IP ($p = 0,005$). Este resultado demonstra que a produção de IgG1 é mais tardia quando a infecção é feita pela via oral. Essa reação teve um "cut-off" igual a 0,22 (Fig. 6 A)

Conforme descrito nos procedimentos de isotipagem anteriores, amostras de soros de animais infectados por dias diferentes foram analisados quanto a produção de IgG2a (Fig.6 B). Após 12 dias da inoculação, a IgG2a foi detectada nas amostras de soro dos animais infectados pelas vias oral ($p = 0,02$) e IP ($p = 0,008$). Não houve diferença significativa de produção de IgG2a entre os animais com 12 ($p = 0,14$) e 21 dias de infecção ($p = 0,45$). Houve um aumento significativo deste anticorpo entre os dias 12 e 21 ($p = 0,003$) em camundongos infectados pela via Ip e também em camundongos infectados pela via oral ($p = 0,0005$). A produção de IgG2a foi significativamente maior que a de IgG1, independente da via e do tempo de infecção ($p < 0,04$).

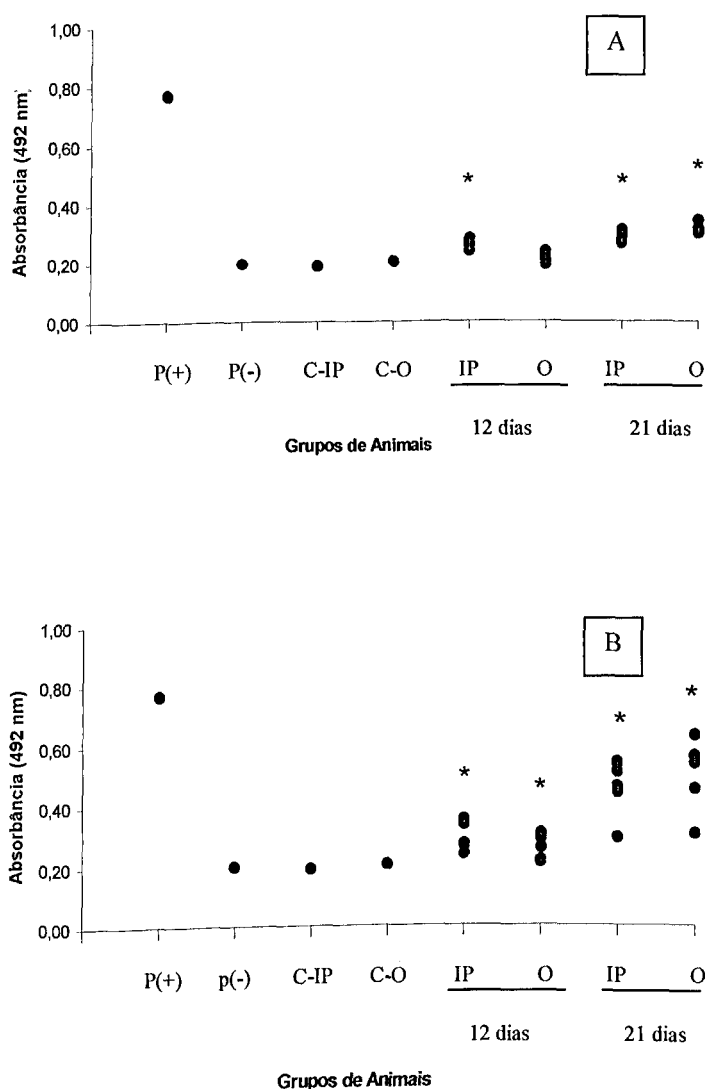


Figura 6 - Detecção de anticorpo IgG1 e IgG2a pelo método ELISA. Camundongos BALB/c foram infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* pelas vias oral (O) e intraperitoneal (IP) sendo sangrados em diferentes dias de infecção para detecção sérica de imunoglobulina dos sorotipos IgG1 (A) e IgG2a (B). Cada grupo de camundongos era composto de 12 animais, sendo 6 para cada via de infecção. C, controles IP e oral; P(+), padrão positivo; P(-), padrão negativo.

4.6 - Dosagem de citocinas e óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura de célula

Os níveis de citocinas foram demonstrados, pelo teste de ELISA, em sobrenadantes de cultura de células esplênicas e de linfonodos (poplíteo e mesentérico) de camundongos BALB/c, com 3, 12 e 21 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, pelas vias oral e intraperitoneal. As células foram cultivadas por 48 horas na presença do mitógeno concanavalina A (Con-A), antígeno solúvel de *T. gondii* (STA) ou meio de cultura. O objetivo desse experimento foi verificar se a resposta celular, através da produção de citocinas, sofreria alteração em seus níveis de síntese em função da variação da via de infecção, do tempo de infecção e do local de resposta.

4.6.1 - Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células

A figura 7A mostra a produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos com 3, 12 e 21 dias de infecção, pela via oral. As células esplênicas de camundongos infectados pela via oral, na presença de STA, produzem IFN- γ a partir do 3º dia de infecção ($990 \pm 0,02$ pg/ml), quando comparadas a produção de IFN- γ pelo grupo controle estimulado por antígeno ($p = 0,01$) e quando comparada à produção por células esplênicas, de camundongos infectados, nas mesmas condições, deixadas apenas na presença de meio ($p = 0,002$). No

12º dia de infecção, células estimuladas por antígeno STA, produziram quantidades aumentadas de IFN- γ ($2940 \pm 0,09$ pg/ml), quando comparada à produção encontrada no dia três, com o estímulo antigênico ($p = 0,0009$). Essa produção aumentada de IFN- γ no décimo segundo dia, estimulada pelo antígeno, manteve-se no vigésimo primeiro dia ($2030 \pm 0,053$ pg/ml; $p = 0,42$). O mitógeno induziu a produção desta citocina nos três dias de infecção, com um pico extremamente elevado no 12º dia ($9670 \pm 0,064$ pg/ml; $p < 0,001$).

As células esplênicas de camundogos infectados pela via intraperitoneal, quando estimuladas pelo antígeno, não produziram IFN- γ no terceiro dia ($p = 0,06$), produziram quantidades significantes desta citocina no 12º dia ($2300 \pm 0,04$ pg/ml; $p = 0,001$) e não produziram no 21º ($970 \pm 0,034$ pg/ml; $p = 0,07$) de infecção, quando comparado ao controle (Fig.7B). Diferentemente do que foi encontrado em camundongos infectados pela via oral, a produção de IFN- γ diminuiu consideravelmente no 21º dia, em células incubadas com antígeno. O mitógeno induziu a produção de IFN- γ nos dias 12 e 21 pós-infecção (Fig.7B).

Fazendo-se uma comparação entre grupos, notou-se que células esplênicas, oriundas de animais infectados de diferentes modos e estimuladas pelo antígeno, somente secretam níveis significante dessa citocina no dia 21, onde células de animais infectados pela via oral produzem maiores níveis de IFN- γ que as células de animais infectados pela via IP ($p = 0,04$).

A figura 8 (A e B) mostra a produção de IFN- γ por células de linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c, após 3, 12 e 21 dias de infecção pelas vias oral e IP. O estímulo antigênico induziu, em

células de camundongos infectados pela via oral, a produção de IFN- γ a partir do 12^o de infecção ($960 \pm 0,003$ pg/ml; $p = 0,032$), quando comparado ao controle. Esses níveis de IFN- γ caíram no vigésimo primeiro dia ($700 \pm 0,003$ pg/ml; $p = 0,0001$) (Fig. 8 A).

O antígeno induziu um índice de produção de IFN- γ , em células de linfonodos mesentéricos de camundongos infectados pela via IP, semelhante às concentrações observadas em camundongos infectados pela via oral. A produção, comparada ao controle só foi vista aos 12 dias ($920 \pm 0,02$ pg/ml; $p = 0,02$), caindo no 21^o dia ($750 \pm 0,008$ pg/ml, $p = 0,030$) (Fig.8 B). A indução de IFN- γ pelo mitógeno foi detectada nos dias 3 e 21 pós-infecção. Comparando-se os grupos, nota-se que não existem diferenças significantes na produção dessa citocina em relação ao estímulo antigênico, ou seja, nos 3 dias considerados nesse experimento, não houve diferença de produção de IFN- γ entre as vias oral e IP.

As células dos linfonodos poplíteos foram analisadas quanto a produção de IFN- γ . Somente as células de linfonodos poplíteos de animais infectados pela via oral produziram essa citocina na presença de antígeno (Fig. 9 A). Os níveis de citocina em animais infectados pela via oral foram detectados apenas nos dias 12 e 21 pós infecção, com índices de $1280 \pm 0,09$ pg/ml ($p = 0,006$) e $1300 \pm 0,09$ pg/ml ($p = 0,005$), respectivamente. Somente a concanavalina A induziu a produção de IFN- γ em células de linfonodos poplíteos de animais infectados pela via intraperitoneal, isso ocorreu no terceiro dia de infecção ($1710 \pm 0,02$ pg/ml) (Fig.9 B). Quando comparados, os grupos oral e IP mostram que houve uma produção maior de IFN- γ pelas células do linfonodo poplíteo de animais infectados pela via oral, após 12 e 21 dias ($p < 0,001$).

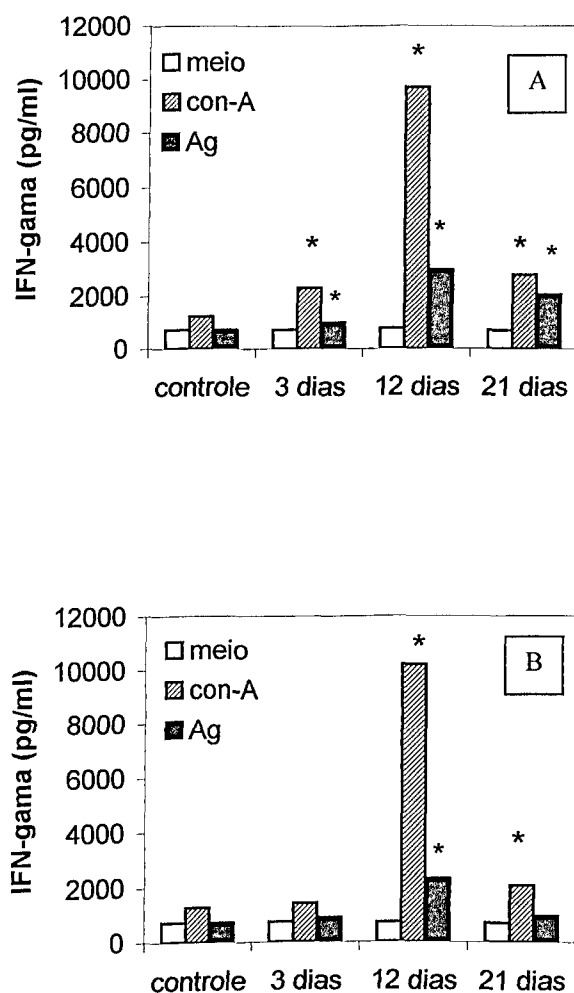


Figura 7 - Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c. Esplenócitos de camundongos BALB/c (2×10^6 células/ml) foram cultivados, em duplicata, a cada três baços por grupo experimental, na presença de meio, Con-A ($2 \mu\text{g/ml}$) e STA ($10 \mu\text{g/ml}$). Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e a secreção de IFN- γ determinada por ELISA. Os resultados representam a média entre dois experimentos. A (oral), B (IP).

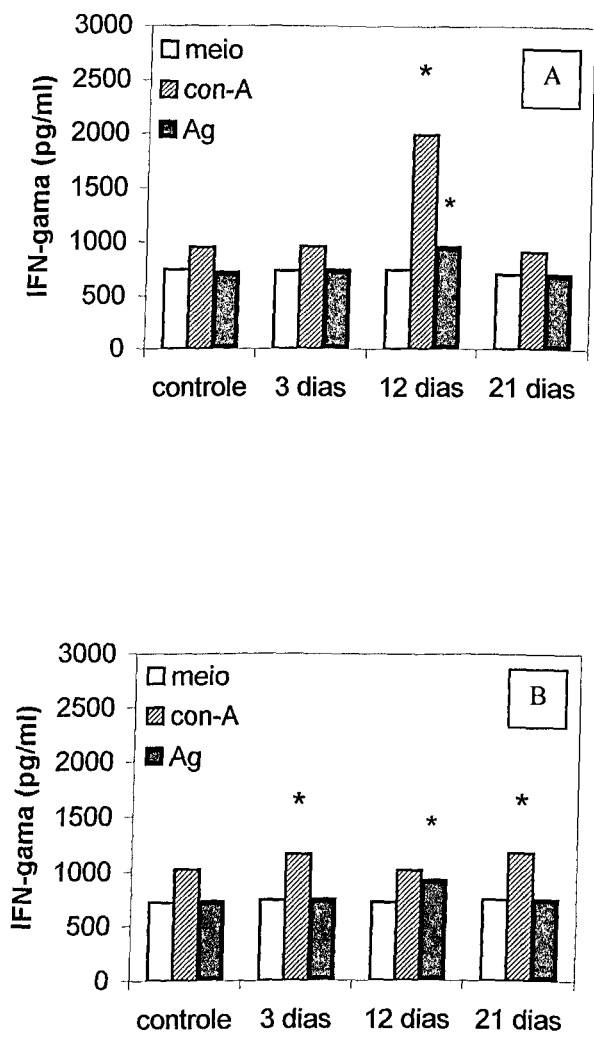


Figura 8 - Produção de IFN- γ por células de linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c. Células (2×10^6 /ml) foram cultivadas, em duplicata, na presença de meio de cultura, Con-A ($2 \mu\text{g/ml}$) e STA ($10 \mu\text{g/ml}$). Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e a secreção de IFN- γ determinada por ELISA. Os resultados representam a média entre dois experimentos. A (oral), B (IP).

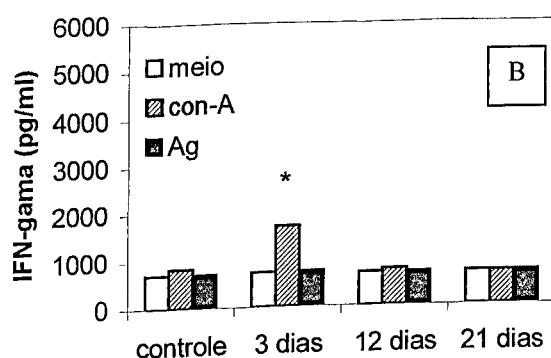
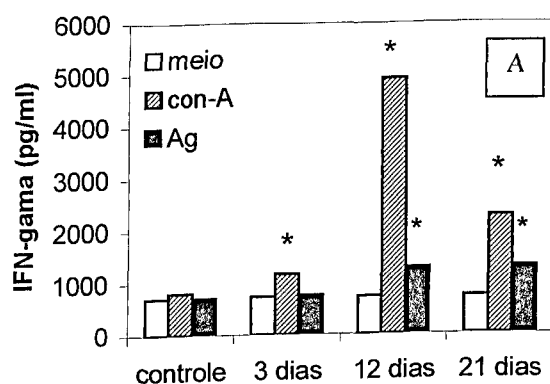


Figura 9 - Produção de IFN- γ por células de linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c. Células (2×10^6 /ml) foram cultivadas, em duplicata, na presença de meio de cultura, Con-A ($2 \mu\text{g/ml}$) e STA ($10 \mu\text{g/ml}$). Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e a secreção de IFN- γ determinada por ELISA. Os resultados representam a média entre dois experimentos. A (oral), B (IP).

4.6.2 - Dosagem de IL-12 (p-40) em sobrenadante de cultura de células

Somente o antígeno solúvel de *T. gondii* estimulou a produção de IL-12 em células esplênicas de camundongos infectados com a cepa ME-49. A figura 10 (A e B) mostra os diferentes níveis de IL-12 encontrados nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas. Células esplênicas de camundongos infectados pela via oral (Fig. 10 A) produziram $1,4 \pm 0,001$ ng/ml no terceiro dia, $2,1 \pm 0,001$ ng/ml no décimo segundo dia e $0,87 \pm 0$ ng/ml no último dia estudado, com diferenças significantes entre grupos, $p < 0,001$. Com esse resultado, nota-se que a produção de IL-12 iniciou-se após três dias de infecção e atingiu o ápice de produção no décimo segundo dia. A figura 10 B mostra os resultados observados em camundongos infectados pela via IP. Diferentemente dos resultados obtidos com a infecção via oral, observou-se um pico de produção de IL-12 no início da infecção (3 dias, $2,6 \pm 0$ ng/ml) e que, esta produção de citocinas, decresce exponencialmente no 12º dia ($0,74 \pm 0,07$ ng/ml; $p < 0,001$), não sendo mais detectada no vigésimo-primeiro dia pós infecção. Estes resultados demonstram que a produção de IL-12 pela via IP é maior (no início da infecção, 3 dias) e menos duradoura que a produção observada na infecção oral.

Embora em níveis bem menores que os observados nas células esplênicas, IL-12 somente foi detectada em sobrenadantes de cultura de linfonodos (poplíteo e mesentérico) de camundongos infectados pela via oral. A figura 11A, mostra que pouquíssima quantidade de IL-12 foi encontrada no sobrenadante de células de linfonodos mesentéricos de camundongos infectados pela via oral, isto

no terceiro dia de infecção. Em células de linfonodos poplíteos de camundongos infectados pela via oral, nota-se a secreção de IL-12 iniciando no 12º dia ($0,64 \pm 0,04$ ng/ml) e diminuindo no 21º dia ($0,32 \pm 0,002$ ng/ml (Fig.11 B). Esta figura também mostra que o mitógeno induziu a produção de IL-12, sendo que, no 12º dia, a produção induzida pelo antígeno foi significativamente maior que a induzida pelo mitógeno ($p = 0,003$). No 21º dia, os níveis de produção de IL-12 estimulados pelo antígeno e pelo mitógeno são iguais ($p = 0,2746$). O antígeno induz uma maior produção desta citocina no 12º dia, quando comparado ao 21º dia ($p = 0,03$).

4.6.3 - Dosagem de IL-10, IL-4 e Óxido Nítrico.

De todos os sobrenadantes analisados neste experimento, somente os esplenócitos de camundongos infectados pela via oral produziram níveis detectáveis da citocina IL-10. A Figura 12 ilustra o aparecimento de IL-10 no 12º dia de infecção ($95 \pm 0,04$ pg/ml) e no 21º dia ($69 \pm 0,09$ pg/ml). A Concanavalina-A também induziu a produção de IL-10 nos animais controles e no 21º dia pós infecção.

Em todos os sobrenadantes estudados não foram encontrados níveis detectáveis de IL-4 e radicais intermediários do nitrogênio (nitrito).

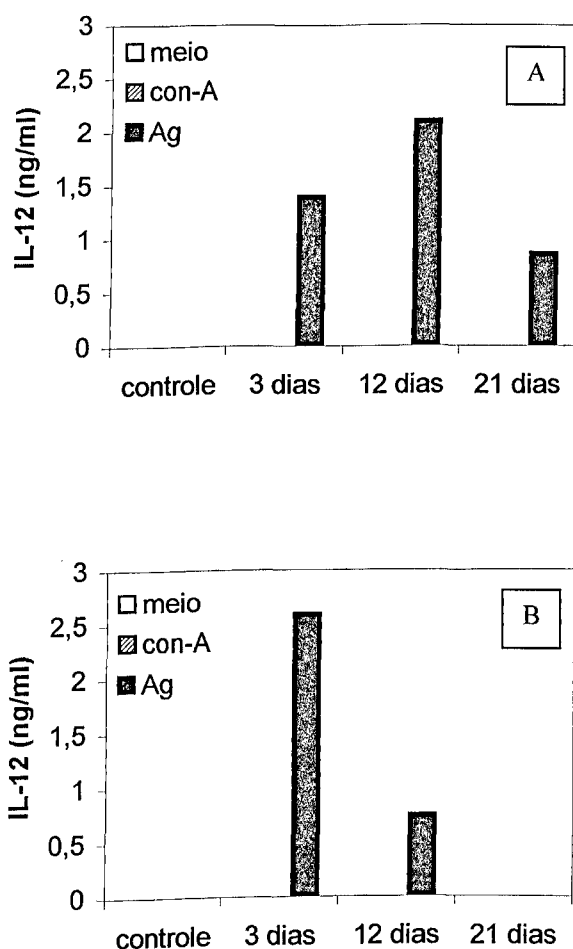


Figura 10 - Produção de IL-12 (p-40) por células de esplênicas de camundongos BALB/c. Células ($2 \times 10^6/\text{ml}$) foram cultivadas, em duplicata, a cada três baços por grupo experimental, na presença de meio de cultura, Con-A ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) e STA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e a secreção de IL-12 determinada por ELISA. Os resultados representam a média entre dois experimentos analisados. A (oral) B (IP).

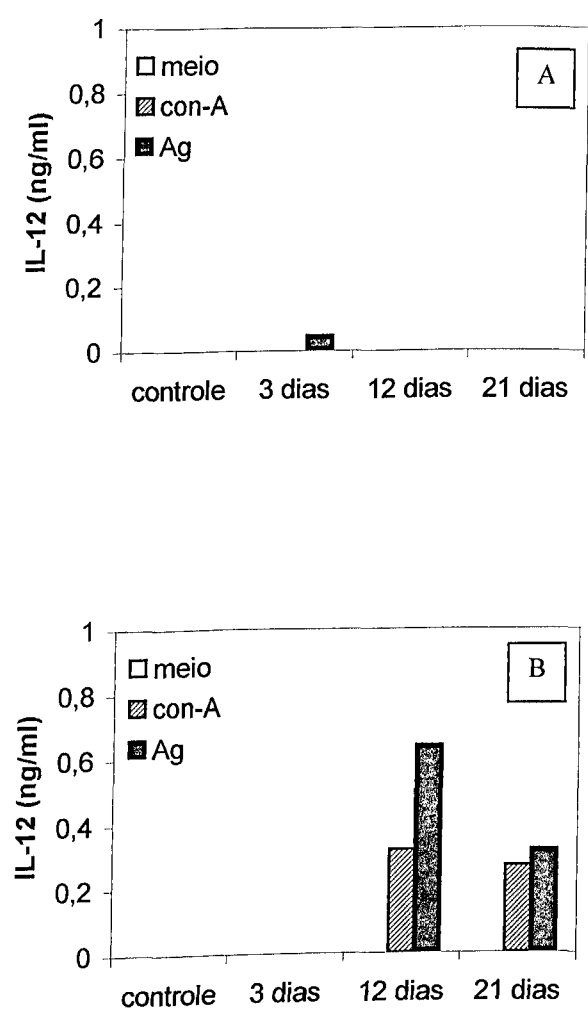


Figura 11 - Produção de IL-12 (p-40) por células de linfonodos de camundongos BALB/c. Células ($2 \times 10^6/\text{ml}$) foram cultivadas, em duplicata, na presença de meio de cultura, Con-A ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) e STA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e a secreção de IL-12 determinada por ELISA. Os resultados representam a média entre dois experimentos. A (linfonodo mesentérico, via oral), B (linfonodo poplíteo, via oral).

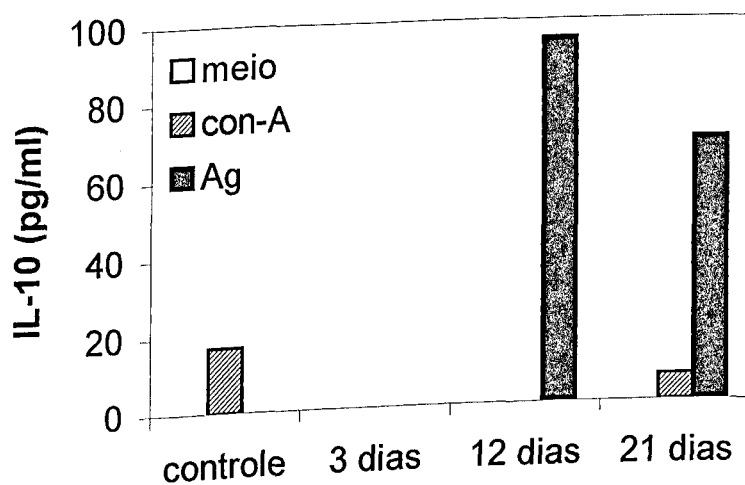


Figura 12 - Produção de IL-10 por células de esplênicas de camundongos BALB/c infectados pela via oral. Células (2×10^6 /ml) foram cultivadas, em duplicata, a cada três baços por grupo experimental, na presença de meio de cultura, Con-A ($2 \mu\text{g/ml}$) e STA ($10 \mu\text{g/ml}$). Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e a secreção de IL-10 determinada por ELISA. Os resultados representam a média entre dois experimentos.

5 - DISCUSSÃO

A resposta imune humoral e celular tem funções importantes na resistência às infecções. De igual importância, elas também atuam mantendo a homeostasia corporal, ficando em estado de constante vigilância contra possíveis alterações patológicas não infecciosas, reconhecendo o que é próprio ou não ao organismo. O estudo da resposta imune frente aos agentes infecciosos é baseado em diversos modelos, estando relacionado a fatores que podem produzir importantes variações nas possíveis respostas resultantes.

A escolha da linhagem de camundongo, por exemplo, é importante quando se vai estudar a atuação do sistema imune frente a parasitas como *Leishmania major* e *T. gondii* (cepa ME-49). Embora sejam letais para camundongos BALB/c, formas promastigotas de *L. major* não são para camundongos C57BL/6 (DOHERTY & COFFMAN, 1996). Por outro lado, camundongos C57BL/6 são susceptíveis a infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii*, enquanto camundongos BALB/c conseguem resistir a esta mesma cepa.

As cepas de parasitas também são importantes no desenvolvimento de diferentes respostas. No caso da toxoplasmose, por exemplo, existem diferenças marcantes advindas da utilização de cepas diferentes. Embora os camundongos BALB/c possam resistir à cepa ME-49, não resistem às cepas virulentas, como a RH.

As abordagens "in vitro" podem também mostrar resultados que podem não ser encontrados no organismo vivo. Johnson & Sayles (1997), citam que estudos "in vitro" podem sugerir quais componentes do sistema imune estão envolvidos na resistência a um determinado

patógeno, entretanto, os imunologistas devem verificar "in vivo" quais desses componentes, verdadeiramente, contribuem para a proteção.

A imunização ou infecção por diferentes vias podem também produzir no organismo do hospedeiro um perfil de resposta imune diferente, dependendo do modelo experimental utilizado. BOURGUIN *et al* (1993) demonstraram que camundongos C57BL/6, imunizados pela via oral, com antígenos de *T. gondii* associados à toxina colérica, desenvolvem uma resposta imune mediada por célula mais efetiva, quando desafiados com cepa avirulenta 76K de *T. gondii*.

GAZZINELLI *et al* (1998), estudando o padrão de resposta imune de camundongos infectados com *Leishmania* sp, *Trypanosoma cruzi* e *T. gondii*, observaram diferentes respostas conforme a via de infecção utilizada, a abordagem experimental ("in vivo" x "in vitro") e o parasita em questão. Eles constataram que quando parasitas foram injetados intraperitonealmente, somente *T. cruzi* e *T. gondii* conseguiram induzir a produção de IL-12 e IFN- γ por células esplênicas. Entretanto, todos os três parasitas, quando injetados pela via subcutânea nos coxins plantares, induziram níveis similares de IL-12 e IFN- γ , detectados pela drenagem de células de linfonodos regionais.

Conforme descrito por CHARDÈS *et al* (1993), após a infecção pela via oral, com cistos da cepa 76K de *T. gondii*, camundongos resistentes desenvolveram respostas com perfis diferentes em seus órgãos. Através da cultura de células ficou demonstrado que células de linfonodos mesentéricos tiveram uma resposta predominantemente tipo Th2 e, por outro lado, células esplênicas produziram citocinas com perfil tipo Th1.

Diferentes estudos têm sido conduzidos na tentativa de estabelecer padrões para os diferentes fatores que podem influenciar a resposta imune. O presente trabalho se preocupou em estabelecer as possíveis variações imunológicas que diferentes vias de infecção poderiam promover em camundongos resistentes ao *T. gondii*, durante a fase aguda da doença. O período de observação estudado, 3, 12 e 21 dias, foi escolhido por refletir três momentos distintos do início da toxoplasmose murina. O primeiro período, 3 dias, é descrito na literatura por fazer parte de uma fase inicial bem definida, que dura até o sétimo dia de infecção, onde a resposta proliferativa de células T, induzida por mitógeno ou antígeno, é extremamente reduzida (CANDOLFI *et al*, 1994; HAQUE *et al*, 1994). O décimo-segundo dia de infecção foi escolhido por representar o momento em que os animais estão apresentando sinais clínicos da doença, sugerindo um período de intensa interação entre hospedeiro e parasita (período compreendido entre 5 a 15 dias, segundo HUNTER *et al*, 1995^a). O dia 21 pós infecção foi escolhido por poder refletir o momento em que os cistos começam a aparecer nos cérebros dos hospedeiros murinos (FERGUSON & HUTCHISON, 1987; HUNTER *et al*, 1992; FERGUSON *et al*, 1994; ODAERT *et al*, 1996). Esse momento marca a etapa inicial de transição da fase aguda para a fase crônica.

As vias oral e intraperitoneal (IP) foram escolhidas para este estudo comparativo. A primeira, por se tratar de um meio de infecção mais próximo daquele que ocorre espontaneamente na natureza e, a segunda, por ser uma das vias de infecção artificial mais utilizadas em animais de laboratório.

No presente trabalho, camundongos BALB/c infectados pelas vias oral e intraperitoneal, com diferentes quantidades de cistos

da cepa ME-49 de *T. gondii*, desenvolveram sinais debilitantes entre os dias 7 e 12 de infecção, resistiram aos parasitas durante estes dias e sobreviveram. Mesmo com o aumento da concentração de cistos, não foram observadas taxas significantes de mortalidade. Os resultados descritos acima concordam com aqueles obtidos por HUNTER *et al* (1995^a). Estes autores, descrevem que camundongos BALB/c infectados com 40 cistos da cepa ME-49 não morrem, apesar de apresentarem caquexia e letargia durante a fase aguda da infecção (entre 5 e 15 dias).

A resposta imune humoral, determinada pela análise de amostras de soros de camundongos infectados, pelas vias O e IP, com 20 cistos da cepa ME-49, demonstrou que, após 3 dias de infecção, os animais não produziram níveis detectáveis de imunoglobulinas totais e que a via IP desenvolveu a produção de uma maior concentração de anticorpos no décimo-segundo dia pós infecção, quando comparada à via oral. Entretanto, após 21 dias de infecção, a via oral induziu um aumento na concentração de imunoglobulinas séricas totais, quando comparada à via IP. O aumento na concentração de anticorpos no dia 21, foi dependente da via de infecção. CHARDÈS *et al* (1990) citam o surgimento das imunoglobulinas IgA e IgG, anti-*T. gondii*, no 14º dia após a infecção, pela via oral, com 40 cistos da cepa 76K. De modo semelhante, camundongos infectados pela via oral, com 300 cistos da cepa ME-49, tiveram produção inicial de anticorpos séricos totais entre o 10º e 14º dia pós infecção (McLeod *et al*, 1984). Portanto, os resultados descritos na literatura mostram que o momento do aparecimento dos anticorpos séricos, em camundongos resistentes infectados com cepas avirulentas, é bastante parecido. No presente

trabalho, entretanto, o surgimento de IgA foi mais tardio ocorrendo no vigésimo primeiro dia, quando a via oral foi utilizada.

A produção de imunoglobulinas foi confirmada pela análise de anticorpos por "Western-blot", onde se verificou um aumento na intensidade da reação no perfil de proteínas no dia 21 pós infecção, em ambas as vias de infecção. O "Western-blot" demonstrou ainda que o antígeno solúvel, produzido a partir de taquizoítas da cepa RH, possui epitopos que podem induzir a resposta imune celular, validando o sistema heterólogo utilizado, ou seja, células de camundongos infectados com a cepa ME-49 podem ser estimuladas por um antígeno produzido a partir de outra cepa, a cepa RH. Os anticorpos de animais infectados com a cepa ME-49, ligaram-se às proteínas antigênicas de taquizoítas da cepa RH, com pesos de 42 e 31 kDa. Coincidentemente, os pesos moleculares destas proteínas são semelhantes aos pesos de duas importantes proteínas de taquizoítas, uma de 30 kDa (SAG1), conhecida por seu papel na adesão e invasão das células hospedeiras (KASPER & MINEO, 1994; MINEO *et al*, 1993; MANGER *et al*, 1998; BOOTHROYD *et al*, 1998), e outra de 43 kDa (SAG3), recentemente descrita por TOMAVO (1996). A SAG3 é conhecida por ter grande homologia com a SAG1.

Curiosamente, uma proteína de peso molecular aproximado de 125 kDa foi detectada no 12º dia de infecção, nas amostras de soros de animais inoculados pela via intraperitoneal. Porém, esta proteína não foi detectada, neste mesmo tempo de infecção, em animais inoculados pela via oral, sendo detectada somente no 21º dia. O mesmo aconteceu com outra proteína de peso molecular aproximado de 63 kDa. Estes resultados demonstram a existência de diferenças no perfil de imunoglobulinas quando a via de infecção é mudada. Neste

modelo, a via oral induziu a produção de algumas imunoglobulinas séricas de forma mais tardia que a via intraperitoneal.

As amostras de soros utilizadas como padrão positivo mostraram que os anticorpos séricos de camundongos infectados com as cepas ME-49 e RH compartilham afinidades e ligam-se principalmente à proteína de 31 kDa encontrada no antígeno de taquizoítas da cepa RH.

ODAERT *et al* (1996) descreveram a cinética e o padrão da expressão de proteínas específicas de bradizoítas em cérebros de camundongos durante a infecção pelo *T. gondii*. Estes autores observaram que parasitas encontrados no cérebro, 6 dias após a ingestão de cistos, expressaram somente proteínas específicas de taquizoítas (SAG1). A expressão de proteínas específicas de bradizoítas (p36) foi encontrada, no dia 9 após a ingestão, em vacúolos contendo simultaneamente parasitas expressando SAG1 e p36 ou em cistos contendo parasitas, expressando somente marcadores específicos de bradizoítas. Esses resultados podem explicar porque que o soro de animais, infectados com a cepa ME-49, possuem anticorpos para uma proteína que é sabidamente específica de taquizoítas.

No presente trabalho, os níveis sintetizados de imunoglobulinas IgA, IgG1 e IgG2a, foram detectados considerando-se suas produções inter grupos (via IP x via oral 12 dias; via IP x via oral 21 dias) e entre grupos (via IP 12 dias x via IP 21 dias; via oral 12 dias x via oral 21 dias).

Algumas funções e utilizações da imunoglobulina A são sugeridas em trabalhos que enfocam estratégias de imunização (MINEO *et al*, 1993; BAO *et al*, 1993). Outros estudos têm mostrado

que a produção de IgA pode ser vista em indivíduos com sorologia positiva para toxoplasmose. Essa produção aparece durante a fase aguda da infecção e persiste após os títulos de IgM terem caído (KASPER & BOOTHROYD, 1993).

Quando comparado ao grupo controle, verificou-se no presente trabalho que os animais infectados após 12 dias, pela via oral, não produzem IgA e animais infectados pela via IP, sim. Vinte e um dias após a ingestão dos cistos, níveis detectáveis de IgA aparecem nos soros de camundongos infectados por ambas as vias. A produção de IgA induzida pela via IP não aumentou do 12º para o 21º dia pós-infecção. É interessante ressaltar que, comparando-se o efeito das vias, no vigésimo primeiro dia de infecção, não há alteração dos níveis de IgA entre animais infectados pelas via IP ou oral. Desta maneira, embora a síntese desta imunoglobulina possa ter sido estimulada pela via IP após 12 dias de infecção, diferentemente da via oral que não produz estímulo para sua síntese neste dia, ambas as vias estimulam de forma semelhante sua produção no dia 21. É importante destacar que, embora tenha ocorrido a produção de IgA sérica, não é possível inferir que o mesmo fenômeno possa estar ocorrendo com a produção de IgA secretória, como observado por MINEO *et al* (1993) e BAO *et al* (1993). Entretanto, os resultados encontrados por CHARDÈS *et al* (1990) demonstram que anticorpos IgA anti-*T. gondii* encontrados em amostras de soro, secreções intestinais e leite, reconhecem os mesmos antígenos principais do parasita, com 22, 28, 30 e 43 kDa. Isto sugere que a produção de IgA específica parece não estar restrita a um compartimento biológico apenas.

No décimo segundo dia após a ingestão de cistos, anticorpos IgG1 só foram encontrados nos soros de animais infectados pela via

IP, repetindo o que aconteceu com a produção de IgA. Esta imunoglobulina apareceu no soro dos animais infectados após 21 dias de infecção, de modo independente da via de inoculação. Entretanto, a via oral induziu neste período uma maior produção desta imunoglobulina quando comparada com a via IP. Foi notado também um aumento significativo da concentração de IgG1 do dia 12 para o dia 21 em animais infectados pela via IP.

Níveis significantes de IgG2a foram detectados nos dias 12 e 21 pós infecção. As vias de infecção mostraram não influenciar a produção desta imunoglobulina, pois não foram observadas diferenças significantes entre os grupos. A concentração de IgG2a aumentou do dia 12 para o dia 21.

A imunidade celular foi estudada através da produção de citocinas secretadas nos sobrenadantes de células esplênicas e de linfonodos (mesentérico e poplíteo). Este experimento mostrou que células produzem IFN- γ com tempo de infecção e estímulos diferentes. Exceto as células de linfonodos poplíteos de animais infectados pela via IP, todas as outras apresentaram produção significativa de IFN- γ quando estimuladas por antígeno e comparadas ao controle. O perfil da produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos infectados pelas via oral e IP foi bastante semelhante durante o dia 12 pós-infecção. A via IP não induziu a produção desta citocina após 3 e 21 dias de infecção, diferentemente da via oral, que conseguiu induzir. Durante o 21º dia de infecção, houve uma diferença significativa de secreção desta citocina, com a via oral induzindo uma maior produção de IFN- γ . As células de linfonodos mesentéricos de animais infectados, pelas vias oral e IP, estimuladas por antígeno não

mostraram diferenças significantes de produção de IFN- γ . Quando comparadas, as produções desta citocina por estas células, nos dias e vias citadas anteriormente, nota-se que os índices são semelhantes. Interessantemente, células de linfonodos poplíteos, quando cultivadas nas mesmas condições, revelaram a existência de diferenças entre as vias. As células destes linfonodos, quando oriundas de animais infectados pela via oral, produziram quantidades aumentadas de IFN- γ nos dias 12 e 21 pós infecção, em relação à produção desta citocina por células originárias de animais infectados pela via IP e também estimuladas pelo antígeno STA.

Com relação ao perfil da síntese de IL-12, somente antígeno solúvel de *T. gondii* induziu a produção desta citocina de maneira muito distinta. Células de baço de animais infectados pela via oral produziram IL-12 nos três dias de estudo. As células de animais infectados pela via IP produziram esta citocina nos dias 3 e 12, não produzindo no dia 21. A produção de IL-12 em células de baços de animais infectados pela via IP produziram níveis significantemente maiores, no terceiro dia de infecção, que as células de animais infectados pela outra via. No décimo segundo dia, houve uma inversão nos níveis produzidos desta citocina, com as células obtidas dos animais inoculados pela via oral produzindo maiores níveis que as da via IP. Ainda, as células dos animais inoculados pela via oral, após 21 dias de infecção, produziram IL-12, fato que não foi observado nas células da outra via, neste mesmo período. É importante destacar que somente as células dos linfonodos mesentéricos e poplíteos, coletadas de animais que receberam cistos pela via oral, demonstraram, produção de IL-12 embora em níveis significantemente menores que os observados pelas células esplênicas.

Interessantemente, a interleucina IL-10 somente foi detectada em sobrenadantes de culturas de esplenócitos de animais infectados pela via oral e não foram encontrados níveis detectáveis de IL-4 e nitrito em todos os outros sobrenadantes estudados.

SNAPPER & PAUL (1987), descreveram que o IFN- γ induz a síntese de IgG2a, inibindo a síntese de outras imunoglobulinas, como a IgG1. A IL-4 promove um efeito contrário, ela estimula a produção de IgG1 e inibe a síntese de IgG2a. Vários outros autores descreveram esse fenômeno envolvendo abordagens de imunização (GERMANN *et al*, 1995) e experimentos com parasitas, tais como *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni*, *Giardia muris* e *T. gondii* (KRISHNAN *et al*, 1996; MOUNTFORD *et al*, 1996; VENKATESAN *et al*, 1996; BURKE *et al*, 1994). É interessante destacar que a síntese de IgG2a, observada neste trabalho, foi significativamente maior que a de IgG1, nos diferentes tempos de infecção. Além disso, foi observada uma predominância da produção de citocina do perfil Th1, visto através da produção de IFN- γ , demonstrando concordância entre a resposta celular e humoral, conforme citado anteriormente. GERMANN *et al* (1995), citam que a IL-12 aumenta a síntese de IgG2a, IgG2b e IgG3. Este aumento de produção de anticorpos depende da síntese de IFN- γ , que é muito influenciado pela IL-12. NGUYEN *et al* (1998), conseguiram detectar a expressão de mRNA de IL-12 (p-40) e IFN- γ em células esplênicas de camundongos dois dias após a infecção. Essa expressão de mRNA aumentou no 30º dia após a ingestão dos cistos. Estes autores não conseguiram detectar a citocina do padrão Th2 (IL-4), sugerindo, com isto, que a IL-12 conseguiu influenciar a produção de citocinas,

dirigindo sua produção para um padrão predominante do tipo Th1. Este fato também se repetiu neste trabalho, pois a citocina IL-4 não foi detectada em nenhum dos grupos estudados. Ainda, no presente trabalho, a citocina IL-10 somente foi detectada na cultura de esplenócitos de animais infectados pela via oral. Este resultado pode sugerir que a via oral estimula a produção de IL-10 e, com isso, pode modular a infecção de uma maneira diferente daquela observada pela via intraperitoneal. A infecção pela via IP estaria estimulando o predomínio de uma resposta do tipo Th1, que pode mascarar fortemente a produção de citocinas do perfil Th2 e impedir que as mesmas possam ser detectadas. De acordo com KHAN *et al* (1994), provavelmente a resposta imune primária do hospedeiro frente ao *T. gondii* envolva a produção de IL-12, que estimula a proliferação de células NK e a produção de IFN- γ . Após a fase aguda da infecção ter iniciado, o parasita, por sua vez, estimularia a produção de IL-10 no hospedeiro que inibe a produção de IL-12 e IFN- γ , evitando os efeitos indesejáveis de uma hiperpolarização da resposta imune com perfil Th1.

A não detecção de uma citocina do perfil Th2, como a IL-4, não sugere a sua inexistência. Como foi observado neste trabalho, a produção de imunoglobulinas do isotipo IgG1 garante, em parte, a existência de citocinas do tipo Th2. A presença da IL-10, detectada nos sobrenadantes de cultura de células do baço de animais infectados pela via oral, além de mostrar a presença de uma citocina do tipo Th2, mostra também que existem diferenças quando se altera a via de infecção. Conforme citado anteriormente, animais infectados pela via oral, produzem concentrações detectáveis de IL-10 no baço, diferentemente do que ocorre com animais infectados pela via IP.

No presente trabalho, durante terceiro dia de infecção, a imunidade humoral mostrou-se baixa e a resposta celular pôde ser constatada através da produção de IFN- γ e IL-12 pelas células esplênicas, principalmente. Segundo JOHNSON & SAYLES (1997), embora as células "natural killer" possam ser encontradas na placa de Peyer e na lâmina própria de camundongos não infectados, seu número é bastante limitado nestes sítios. Ao contrário, as células NK são mais abundantes no baço e no sangue. Desde que o baço é um dos primeiros sítios no qual os taquizoítas podem ser detectados após a infecção oral dos camundongos, é muito provável que a ativação de células NK, induzida por antígeno e dependente de IL-12, ocorra inicialmente neste órgão.

Células esplênicas podem sintetizar IL-12 em resposta ao estímulo de produtos antigênicos de *T. gondii*, "in vivo" e "in vitro", e a produção de IL-12 pode induzir a produção IFN- γ por células NK (GAZZINELLI *et al* 1993; REIS & SOUZA *et al* 1997). De acordo com SUMYUEN *et al* (1995), o acúmulo de células NK e a produção de IFN- γ têm início por volta do terceiro dia após a infecção com cistos de *T. gondii*. HUNTER *et al* (1995^a), mostraram que a depleção "in vivo" de células NK, em camundongos imunocompetentes, consegue abolir a resposta imune protetora dependente de IL-12. Estes trabalhos sugerem que, durante o início da infecção, as células NK são fundamentais para a proteção do hospedeiro murino, principalmente através da produção de IFN- γ .

Durante o 12^o dia de infecção, observou-se no presente trabalho que a imunidade humoral ainda está iniciando, enquanto que a resposta celular atinge seu pico, como verificado através dos

maiores níveis de IFN- γ e IL-12 produzidos. Neste período da infecção, os animais apresentaram sinais marcantes da infecção, como letargia e caquexia, independente da via de infecção. Não foram detectados cistos cerebrais nos diferentes grupos estudados durante esse período e foi evidente o aumento de tamanho dos baços em animais infectados pela via oral. O aumento do tamanho de baços, de animais infectados pela via oral, durante este período, também foi descrito por DECKERT-SCHLUTER *et al* (1995).

Com 12 dias de infecção, células esplênicas e células de linfonodos mesentéricos de animais infectados por ambas as vias, assim como células de linfonodos poplíteos de animais infectados pela via oral, produziram níveis significantes de IFN- γ , demonstrando que a inoculação pela via oral induz uma maior produção dessa citocina e que o aumento de IFN- γ pode ser um fator da resposta imune importante para o controle da doença neste período. Recentemente, SCHARTON-KERSTEN *et al* (1996) propuseram que a IL-12 parece ser importante na promoção da resistência, em animais imunocompetentes ou não, e que, esta citocina não necessita da presença de IFN- γ para ser sintetizada. Deste modo, segundo esses autores, células esplênicas de camundongos nocauteados para IFN- γ produzem níveis significantes de IL-12, quando estimuladas por antígeno solúvel de *T. gondii*, na cultura de células. O resultado descrito acima pode ser relacionado com o que foi proposto por Reis e Souza *et al* (1997) que mostraram que células dendríticas, e não macrófagos, podem ter um papel central na resposta imune, produzindo IL-12 sem serem primadas. Estas observações podem explicar o motivo pelo qual não foi possível detectar óxido nítrico

(nitrito) no presente trabalho, sendo possível a detecção de níveis significantes de IL-12. Os macrófagos produzem IL-12, IL-10 e nitrito quando são colocados na presença de antígenos de *T. gondii*. Pode ser que, com a concentração de células utilizadas na cultura, não tenha sido possível detectar a síntese de nitrito pela população de macrófagos, mas foi perfeitamente possível detectar os níveis de IL-12 produzida por uma população heterogênea de células, composta por macrófagos, células dendíticas, neutrófilos e outras.

No 21º dia de infecção foram observados vários cistos de *T. gondii* nos cérebros de todos os animais infectados por ambas as vias. Os baços de animais infectados pela via oral continuaram hiperplásicos neste período, diferentemente do que foi observado nos baços de animais infectados pela via IP. Durante este momento da infecção foi verificado um aumento significativo nos níveis de IgA, IgG1 e IgG2a séricas. Os níveis de IFN- γ e IL-12 no baço diminuíram neste período. DECKERT-SCHULUTER *et al* (1995) citam a presença de mRNA de IFN- γ nos cérebros e baços de camundongos na fase aguda da infecção. Durante a fase aguda, estes autores não detectaram mudanças nos níveis de mRNA para esta citocina no baço, mas houve um forte aumento de mRNA no cérebro dos animais, associado ao desenvolvimento da fase crônica. Níveis de mRNA para IL-12, segundo estes mesmos autores, foram detectados durante a fase aguda, nestes órgãos, mas mantiveram-se inalterados durante a fase crônica. Os resultados descritos acima demonstram que, embora o IFN- γ possa estar diminuído no baço, provavelmente, eles podem estar aumentados no cérebro, durante este período, talvez levando ao encistamento do parasita. Ainda não foi possível determinar se o IFN-

γ pode induzir a formação de cistos "in vivo". Sabe-se, porém, que esta citocina, além de impedir a ruptura dos cistos e a exacerbação da encefalite toxoplásmica (SUZUKI *et al*, 1989), pode induzir a expressão de antígenos específicos de bradizoítas em taquizoítas (BOHNE *et al*, 1993^b).

JOHNSON & SAYLES (1997), citam que o estudo dos eventos iniciais que ocorrem, tanto no intestino e tecidos linfóides associados, como no baço, após a infecção pela via oral com cistos de *T. gondii*, são necessários para responder questões importantes relacionadas à resposta inicial protetora frente a este parasita. No presente trabalho, não foi possível estabelecer diferenças dos perfis Th1 e Th2 de citocinas nos diferentes órgãos estudados. CHÀRDES *et al* (1993), conseguiram demonstrar padrões diferentes de citocinas nos linfonodos mesentéricos (tipo Th2) e nos baços (tipo Th1). Foi possível observar, no entanto, no presente trabalho que a inoculação pela via oral conseguiu induzir níveis de IFN- γ e IL-12 nos baços e linfonodos mesentéricos e poplíteos. Isto sugere que a via oral consegue estimular uma resposta Th1 em todos os órgãos citados e a via IP é capaz de fazer isto de uma maneira bem diferente. Não é possível definir se estes eventos podem ser considerados bons ou ruins, mas podem indicar que a via oral estimula de forma diferente as células do sistema imune do hospedeiro. Células esplênicas de animais infectados pela via oral produziram IFN- γ e IL-12 nos três dias estudados, o que não aconteceu quando a via IP foi utilizada. Ainda, a via oral conseguiu induzir a síntese de IL-10 por células esplênicas e de IL-12 por células dos linfonodos mesentéricos e poplíteos.

BUZONI-GATEL *et al* (1997) demonstraram que, se a via oral é o modo natural de infecção, a produção de IFN- γ por linfócitos intraepiteliais CD8 α/β^+ pode ser uma importante barreira primária contra a infecção aguda e, talvez, contra a infecção recorrente por *T. gondii*. ELY *et al* (1998) descreveram que a administração de antígeno solúvel pela via oral, em camundongos C57BL/6, propiciou o prolongamento da vida desses animais frente ao desafio com cistos de *T. gondii*. Estes autores citaram que a via oral estimulou uma forte resposta imune celular, também observada no presente trabalho, que pode ser benéfica ou não ao hospedeiro. Entretanto, a administração de antígenos do parasita, uma semana antes da infecção pela via oral, consegue diminuir os danos de uma resposta hiperimune tipo Th1.

Através do presente trabalho, foi possível demonstrar a existência de perfis diferentes de respostas imunes, quando se altera a via de inoculação, em camundongos imunocompetentes. A cronificação da doença e a sobrevivência de animais infectados pelas diferentes vias, são eventos que poderiam sugerir que a resposta imune é igual quando se faz a infecção pela vias oral ou intraperitoneal. Entretanto, quando se faz uma análise detalhada do perfil da resposta imune decorrente da infecção pelas diferentes vias de inoculação, importantes diferenças são notadas, como foi descrito neste trabalho. Schlüter *et al* (1998), estudando, "in vivo", a atividade da citocina TGF- β 2 recombinante, em linhagens de camundongos resistentes ou não ao *T. gondii*, observaram que esta citocina exacerba a encefalite toxoplásmica em camundongos C57BL/6 (susceptíveis), diminuindo os níveis de IFN- γ no fluido cerebrospinal e no soro. Por outro lado, quando animais desta mesma linhagem são tratados

com IFN- γ recombinante, os efeitos letais, observados pela atividade da citocina TGF- β 2, são abolidos. Os resultados apresentados por estes autores indicam a existência de uma modulação da encefalite toxoplásmica, através da presença ou não de determinadas citocinas, que é dependente da linhagem de camundongos utilizada, pois a citocina TGF- β 2 não exacerba a encefalite em camundongos BALB/c (resistentes). Isto demonstra que podem existir fatores responsáveis pela modulação da encefalite toxoplásmica e estes podem ser induzidos durante as fases mais precoces de estimulação de uma resposta imune frente ao parasita. No presente trabalho, demonstramos que a via oral estimula a fase inicial da resposta imune de modo diferente da via IP. Portanto, estudos posteriores devem ser realizados para comprovar se animais infectados por vias diferentes apresentam padrões distintos de respostas imunes durante a reativação de cistos de *T. gondii*. Se a resposta imune adquirida durante a infecção primária, ocorrida pela via oral, puder modular diferencialmente a resposta imune durante a reativação de cistos, então será mais correto empregar esta via quando se for estudar modelos experimentais de encefalite toxoplásmica murina.

Sabendo-se que a forma de infecção natural ocorre, principalmente, pela ingestão de cistos e oocistos e que os eventos imunológicos podem ser mudados de acordo com a via de infecção, o presente trabalho sugere a necessidade da utilização da via oral quando se deseja estudar o perfil da resposta imune que ocorre durante a toxoplasmose murina.

6 - CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados no presente trabalho, pode-se concluir que:

- 1- Animais BALB/c são resistentes à cepa ME-49 de *T. gondii*, quando infectados com 20 cistos e a alteração da via de infecção, da via oral para a via intraperitoneal, não é um fator que ocasione modificações nas taxas de sobrevivência.
- 2- Amostras de soros de animais infectados com a cepa ME-49 possuem anticorpos que reconhecem antígenos da cepa RH.
- 3- Amostras de soro de animal infectado com a cepa ME-49 e amostras de soro de animal infectado com a cepa RH possuem anticorpos que reconhecem o antígeno específico de taquizoíta, p30.
- 4- A via intraperitoneal induz a produção mais precoce de IgA e IgG1, no 12º dia de infecção.
- 5- A via oral e a via intraperitoneal induzem a produção de IgG2a no 12º e 21º dia de infecção.
- 6- As células esplênicas de animais infectados pela via oral produzem IFN- γ e IL-12 nos dias 3, 12 e 21 pós-infecção.
- 7- Somente as células esplênicas de animais infectados pela via oral produzem, nas condições estudadas, IL-10 em níveis detectáveis.
- 8- As células de linfonodos mesentéricos e poplíteos de animais infectados pela via oral produzem níveis detectáveis de IL-12.
- 9- As células de linfonodos poplíteos de animais infectados pela via IP não produzem níveis detectáveis de IFN- γ .

- 10- Por ser a via natural de infecção e por induzir diferenças significativas no perfil da resposta imune, durante a toxoplasmose murina aguda, a via oral deve ser incluída nos estudos da toxoplasmose experimental.
- 11- Novos estudos são necessários no sentido de se verificar se, durante a reativação de uma infecção experimental de camundongos BALB/c pelo *T. gondii*, o perfil da resposta imune também é dependente da via de inoculação.

7 - RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito da via de infecção, oral e intraperitoneal (IP), na resposta imune humoral e celular em camundongos imunocompetentes e resistentes ao *Toxoplasma gondii*. Camundongos BALB/c, fêmeas, foram inoculados com 20 cistos da cepa ME-49 e sacrificados nos dias 3, 12 e 21 pós-infecção. Amostras de sangue foram coletadas para isotipagem de imunoglobulinas e células do baço e linfonodos mesentéricos e poplíteos foram cultivadas na presença de antígeno solúvel para análise do perfil de citocinas. Os animais não apresentaram diferentes taxas de sobrevivência para ambas as vias de inoculação. As amostras de soros dos animais infectados com a cepa ME-49 apresentaram anticorpos que reconheceram antígenos da cepa RH. A análise sorológica mostrou que a infecção IP induziu a produção de IgA e IgG1 séricas mais precocemente que a via oral (12º dia), e ambas as vias induziram a produção de IgG2a neste período. As células esplênicas de animais infectados pela via oral produziram IFN- γ e IL-12 nos três tempos estudados e a via oral foi a única via a induzir a síntese de IL-10 pelas células do baço. Esta via também estimulou a síntese de IL-12 em células dos linfonodos poplíteos e mesentéricos. Não foram detectados níveis de IFN- γ na cultura de células de linfonodos poplíteos de animais infectados pela via IP. Estes resultados sugerem que a via natural de infecção (oral) induz diferenças significantes na resposta imune de animais imunocompetentes e deve ser a via de eleição no estudo da toxoplasmose murina.

8 - ABSTRACT

The profile of the immune response was evaluated in the resistant immunocompetent BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii* by different inoculation routes. Female mice (6-8 weeks old) were orally or intraperitoneally infected with 20 brain cysts of ME-49 strain of *T. gondii*. At different periods post-infection, i.e. 3, 12 and 21 days, blood samples were collected for immunoglobulin isotyping and their spleens and mesenteric and popliteal lymph nodes were removed for measurement of the cytokine levels in the supernatant of the cell suspensions submitted to cell culture. The survival rates were not different for the animals inoculated by the different routes. Serum samples of the animals infected with ME-49 strain presented antibodies that recognized antigens of the RH strain. The serological analysis showed that only the intraperitoneal infection induces the production of the detectable levels of IgA and IgG1 at day 12, even though the production of the IgG2a was detected for both routes of infection at this period. The spleen cells of the orally infected animals were able to produce IFN- γ and IL-12 at day 3, 12 and 21 post-infection. In addition, the cells of this group were the only one that was able to produce IL-10. The orally infected mice also showed production of IL-12, when mesenteric and popliteal lymph node cells were tested. It was not detected IFN- γ in the culture of popliteal lymph node cells, when the animals were infected by intraperitoneal route. Thus, these results suggested that the oral infection, the natural route of the host infection by *T. gondii*, should be included in the protocols which purpose is the study of the immunological features in experimental toxoplasmosis.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAO, S., GOLDSTONE, S. & HUSBAND, A.J. Localization of IFN- γ and IL-6 mRNA in murine intestine by *in situ* hybridization. **Immunology**. **80**: 656-670, 1993.
- BEAGLEY, K.W., FUJIIHACHI, K., LAGOO, A.S., LAGOO-DEENADAYLAN, S., BLACK, C.A., MURRAY, A.M., SHARMANOV, A.T., YAMAMOTO, M., MCGHEE, J.R., ELSON, C.O. & KIYONO, H. Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subset isolated from murine small versus large intestine. **The Journal of Immunology**, **154**: 5611-5619. 1995.
- 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**. **79**: 485-487, 1993^a.
- BOHNE, W., HEESEMANN, J. & GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. **Infection and Immunity**. **61**: 1141-1145, 1993^b.

- BOOTHROYD, J.C., HEHL, A., KNOLL, L.J. & MANGER, I.D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International Journal of Parasitology**. **28**(1), 3-9, 1998.
- BOURGUIN, I., CHARDÈS, T. & BOUT, D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6. **Infection and Immunity**. **61**(5): 2082-2088, 1993.
- BROWN, C.R., HUNTER, C.A., ESTES, R.G., BECKMANN, E., FORMAN, J., DAVID, C., REMINGTON, J.S. & McLEOD, R. Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma gondii* cyst burden and encephalitis. **Immunology**. **85**: 419-428, 1995.
- BURKE, J.M., ROBERTS, C.W., HUNTER, C.A., MURRY, M. & ALEXANDER, J. Temporal differences in the expression of mRNA for IL-10 and IFN- γ in the brains and spleens of C57BL/10 mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**. **16**: 305-314, 1994.
- BUZONI-GATEL, D., LEPAGE, A.C. DIMIER-POISSON, I.H., BOUT, D.T., KASPER, L.H. Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**. **158**: 5883-5889, 1997.

- CANDOLFI, E., HUNTER, C.A. & REMINGTON, J.S. Mitogen-and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. **Infection and Immunity**, **62**(5): 1995-2001, 1994.
- CHANG, H.R., GRAU, G.E. & PECHÈRE, J.C. Role of TNF and IL-1 in infection with *Toxoplasma gondii*. **Immunology**. **69**: 33-37, 1990.
- CHARDÈS, F.T., VELGE-ROUSSEL, P., MEUELE, M.N., BUZONIGATEL, D. & BOUT, D. Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. **Immunology**, **78**: 421-429, 1993.
- DECKERT-SCHLÜTER, M., ALBRECHT, S. HOF, H. WIESTLER, O.D. & SCHLÜTER, D. Dynamics of the intracerebral and splenic cytokine mRNA production in *Toxoplasma gondii*-resistant and susceptible congenic strains of mice. **Immunology**. **85**: 408-418, 1995.
- DING, A.H., NATHAN, C.F. & STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**. **141**: 2407, 1988.
- DOHERT, T.M. & COFFMAN, R.L. *Leishmania major*: effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c. **Experimental Parasitology**. **84**: 124-135, 1996.

ELY, K.H., KHAN, I.A. & KASPER, L.H. Oral feeding of toxoplasma lysate antigen results in reversal of lethal hyperimmune response in C57BL/6 mice. **Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: opportunistic infections in AIDS**. 116, 1998 (Abstract).

FADUL, C.E., CHANNON, J.Y. & KASPER, L.H. Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. **Infection and Immunity**. 63(11): 4290-4294, 1995.

FERGUSON, D.J.P. & HUTCHISON, W.M. Comparison of the development of avirulent and virulent strains of *Toxoplasma gondii* in the peritoneal exudate of mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 75(5): 539-546, 1981.

FERGUSON, D.J.P. & HUTCHISON, W.M. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. **Parasitology Research**. 73: 483-491, 1987.

FERGUSON, D.J.P., HUSKINSON-MARK, J., ARAUJO, F.G. & REMINGTON, J.S. A morphological study of chronic cerebral toxoplasmosis in mice: comparison of four different strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**. 80: 493-501, 1994.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Ícone, 1997. 686p. p. 70.

- GAZZINELLI, R.T., ELTOUM, I., WYNN, T.A & SHER, A. 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**. 151(7): 3672-3681, 1993^a.
- GAZZINELLI, R.T., HIENY, S. WOLF, S. & SHER, A. IL-12 is required for the T-cell independent induction of IFN- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. 90: 6115-6119, 1993^b.
- GAZZINELLI, R.T., TALVANI, A. CAMARGO, M.M., SANTIAGO, H.C. OLIVEIRA, M.A.P., VIEIRA, L.Q., MARTINS, G.A., ALIBERTI, J.C.S. & SILVA, J.S. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 31(1): 89-104, 1998.
- GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HIENY, S., SCHARTON-KERSTEN, T., CHEEVER, A., KUHN, R. MULLER, W., TRINCHIERI, G. & SHER, A. 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**. 157: 798-805, 1996.

- GERMANN, T., BONGARTZ, M., DLUGONSKA, H., HESS, H. SCHMITT, E., KOLBE, L., KOLSCH, E., PODLASKI, F.J., GATELY, M.K. & RUDE, E. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. **European Journal of Immunology**. **25**: 823-829, 1995.
- HAQUE, S., KHAN, I., HAQUE, A. & KASPER, L. Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. **Infection and Immunity**. **62**(7): 2908-2916, 1994.
- HAYASHI, S., CHAN, C., GAZZINELLI, R. & ROBERGE, F.G. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. **The Journal of Immunology**. **156**: 1476-1481, 1996.
- HOWE, D.K. & SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. **Experimental Parasitology**. **78**: 242-245, 1994
- HOWE, D.K. & SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**. **172**: 1561-1566, 1995.
- 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**. **64**(12): 5193-5198, 1996.

- HUNTER, C.A., BERMUDEZ, L. BEERNINK, H. WAEGELL, W. & REMINGTON, J.S. Transforming growth factor- β inhibits interleukin-12-induced production of interferon- γ by natural killer cells: a role for transforming growth factor- β in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Immunology**. **25**: 994-100, 1995^b.
- HUNTER, C.A., CANDOLFI, E., SUBAUSTE, C., CLEAVE, V.V. & REMINGTON, J.S. Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. **Immunology**, **84**: 16-20, 1995^a.
- HUNTER, C.A., CHIZZONITE, R. & REMINGTON, J.S. IL-1 β is required for IL-12 to induce production of IFN- γ by NK cells. **The Journal of Immunology**. **155**: 4347-4354, 1995^c.
- 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**. **22**: 2317-2322, 1992.
- HUNTER, C.A., SUBAUSTE, C., Van CLEAVE, V.H. & REMINGTON, J.S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii* SCID mice: regulation by interleukin 10, interleukin 12 and tumor necrosis factor-alpha. **Infection and Immunity**. **62**(7): 2818-2824, 1994.

- JOHNSON, L.L. & SAYLES, P.C. Interleukin-12, dendritic cells, and the initiation of host-protective mechanisms against *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**. **186(11)**: 1799-1802, 1997.
- KASPER, L.H. Identification of stage specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. **57**: 668-672, 1989.
- KASPER, L.H. & BOOTHROYD, J. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In WARREN, K.S.: **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. 3 ed., Boston: Blackwell Scientific Publications, 610p., p.269-301, 1993.
- KASPER, L.H. & BUZONI-GATEL, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. **Parasitology Today**. **14(4)**: 150-156, 1998.
- KASPER, L.H., MATSUURA, T. & KHAN, I. Il-7 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**. **155**: 47-98, 1995.
- KASPER, L.H. & MINEO, J.R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**. **10(5)**, 1994.
- KHAN, I.A., ELY, K.H. & KASPER, L.H. Antigen-specific CD8⁺ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **The Journal of Immunology**. **152**: 1856-1860, 1994^b.

- KHAN, I.A. & KASPER, L.H. IL-15 augments CD8⁺ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **The Journal of Immunology**. **157**: 2103-2108, 1996^b.
- KHAN, I.A., MATSUURA, T., FONSEKA, S. & KASPER, L.H. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1^{-/-} mice. **The Journal of Immunology**. **156**: 636-643, 1996^a.
- KHAN, I.A., MATSUURA, T. & KASPER, L.H. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. **Infection and Immunity**. **62(5)**: 1639-1642, 1994^a.
- KITTAS, C. & HENRY, L. Effect of sex hormones on the response of mice to infection with *Toxoplasma gondii*. **Br. J. Exp. Pathol.** **61**: 590-600, 1980.
- KRISHNAN, L., GUILBERT, L.J., RUSSEL, A.S., WEGMANN, T.G., MOSMANN, T.R. & BELOSEVIC, M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leshmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- γ responses and increased production of T helper 2 cytokines. **The Journal of Immunology**. **156**: 644-652. 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**. **227**, 680-685, 1970.

- LANE, A., SOETE, M., DUBREMETZ, J.F. & SMITH, J.E. *Toxoplasma gondii*: Appearance of specific markers during the development of tissue cysts in vitro. **Parasitology Research**. **82**: 340-346, 1996.
- LOWRY, H.L. ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L. & RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. **193**: 265-275, 1951.
- LUNDE, M.N. & JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**. **69(5)**: 806-808, 1983.
- MAKIOKA, A. & OHTOMO, H. An increased DNA polymerase activity associated with virulence of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**. **81(6)**: 1021-1022, 1995.
- MANGER, I.D., HEHL, A.B. & BOOTHROYD, J.C. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. **Infection and Immunity**. **66(5)**: 2237-2244, 1998.
- McLEOD, R., EISENHAUER, P., MACK, D., BROWN, C. FILICE, G. & SPITALNY, G. Immune response associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**. **142(9)**: 3247-3255, 1989.

- McLEOD, R., ESTES, R.G., MACK, D.G. & COHEN, H. Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. **The Journal of Infectious Diseases**. **149(2)**: 234-244, 1984.
- MINEO, J.R., McLEOD, R., SMITH, J., KHAN, I.A., ELY, K.H. & KASPER, J.R. Antibodies do *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**. **150(9)**: 3951-3964, 1993.
- MOLL, H. Immune responses to parasites: the art of distinguishing the good from the bad. **Immunology Today**. **17(12)**: 551-552, 1996.
- MOSMANN, T.R. & SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**. **17(13)**: 138-146, 1996.
- MOUNTFORD, A., ANDERSON, S. & WILSON, R.A. Induction of Th1 cell-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni* by co-administration of larval antigens and IL-12 as an adjuvant. **The Journal of Immunology**. **156**: 4739-4745, 1997.
- MOWAT, A. McI. & VINEY, J.L. The anatomical basis of intestinal immunity. **Immunological Reviews**. **156**: 145-166, 1997.

- NABORS, G.S., NOLAN, T., CROOP, W., LI, J. & FARRELL, J.P. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/C x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. **Parasite Immunology**. **17**: 569-579, 1995.
- NEYER, L.E., GRUNIG, G., FORT, M., REMINGTON, J.S., RENNICK, D. & HUNTER, C.A. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. **65(5)**: 1675-1682, 1997.
- NGUYEN, T.D., BIGAIGNON, G., BROECK, J.V., VERCAMMEN, M., NGUYEN, T.N., DELMEE, M., TURNEER, M., WOLF, S.F. & COUTELIER, J.P. Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses. **Infection and Immunity**. **66(6)**: 2991-2995, 1998.
- ODAERT, H., SOETE, M., FORTIER, B., CAMUS, D. & DUBREMETZ, J.F. Stage conversion of *Toxoplasma gondii* in mouse brain during infection and immunodepression. **Parasitology Research**. **82**: 28-31, 1996.

- PEETERMANS, W.E., RAATS, C.J.I., VAN FURTH, R. & LANGERMANS, J.A.M. Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein induces tumor necrosis factor alpha and interleukin 6, reactive nitrogen intermediates, and toxoplasmatic activity in murine peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**. 63(9): 3454-3458, 1995.
- REIS e SOUZA, C., HIENY, S., SCHARTON-KERSTEN, T.M., JANKOVIC, D., CHAREST, H., GERMAIN, R.N. & SHER, A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **The Journal of Experimental Medicine**. 186(11): 1819-1829, 1997.
- ROBERTS, C.W., FERGUSON, D.J.P., JEBBARI, H., SATOSKAR, A., BLUETHMANN, H. & ALEXANDER, J. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**. 64(3): 1996.
- SCHARTON-KERSTEN, T.M., WYNN, T.A., DENKERS, E.Y., BALA, S., GRUNVALD, E., GAZZINELLI, R.T. & SHER, A. In the absence of endogenous IFN- γ mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. **The Journal of Immunology**, 157: 4045-4054, 1996.

- SCHARTON-KERSTEN, T.M., YAP, G. MAGRAM, J. & SHER, A.
Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**. 185(7): 1261-1273, 1977.
- SCHLÜTER, D., BERTSCH, D., FREI, K., HÜBERS, S.B., WIESTLER, O.D., HOF, H., FONTANA, A. & DECKERT-SCHLÜTER, M. Interferon-gamma antagonizes transforming growth factor-beta2-mediated immunosuppression in murine *Toxoplasma* encephalitis. **Journal of Neuroimmunology**. 81(1-2), 38-48, 1998.
- SCOTT, P., PEARCE, E., NATOVITZ, P & SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **The Journal of Immunology**. 139(1): 221-227, 1987.
- SMITH, J.E. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. 25(11): 1301-1309, 1995.
- SNAPPER, C.M. & PAUL, W.E. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**. 236: 944-947, 1987.

- SOETE, 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**. 78: 361-370, 1994.
- STEVENS, M.G., OLSEN, S.C., PALMER, M.V., PUGH, G.W.Jr.. Immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated orally with *Brucella abortus* RB51. **Infection and Immunity**. 64(11)
- SUMYUEN, M.H., GARIN, Y.J.F. & DEROUIN, F. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. **Journal of Parasitology**. 81(2): 327-325, 1995.
- SUZUKI, Y., CONLEY, F.K., & REMINGTON, J.S. Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. **The Journal of Immunology**, 143: 2045-2050, 1989.
- SUZUKI, Y., YANG, Q., YANG, S., NGUYEN, N., LIM, S. LIESENFELD, O., KOJIMA, T. & REMINGTON, J.S. IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis. **The Journal of Immunology**. 157: 2564-2569, 1996.
- TOMAVO, S. The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structures and functions. **Currents Topics in Microbiology and immunology**. 219: 45-54, 1996.

- TOMAVO, S. FORTIER, B., SOETE, M., ANGEL, C., CAMUS, D. & DUBREMETZ, J.F. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. **59**: 3750-3753, 1991.
- VENKATESAN, P., FINCH, R.G. & WAKELIN, D. Comparison of antibody and cytokine responses to primary *Giardia muris* infection in H-2 congenic strains of mice. **Infection and Immunity**. **64**(11): 4525-4533, 1996.
- VILLARD, O., CANDOLFI, E., DESPRINGRE, J.L., DEROUIN, F., MARCELLIN, L. VIVILLE, S. & KIENT, T. Protective effect of low doses of an anti-IL-4 monoclonal antibody in a murine model of acute toxoplasmosis. **Parasite Immunology**, **17**: 233-236, 1995.
- WALKER, W., ROBERTS, G.W. FERGUSON, D.J.P., JEBBARI, H. & ALEXANDER, J. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in IL-12 and IFN- γ production. **Infection and Immunity**. **65**(3): 1119-1121, 1997.
- WARE, P.L. & KASPER, L.H. Strain-specific antigens to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. **55**: 778-783, 1987.

- WEISS, L.M., LAPLACE, D., TANOWITZ, H.B. & WITTNER, M. Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific monoclonal antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**. **166**: 213-215, 1992.
- WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, **7**: 299-316, 1993.
- WOODISON, G. & SMITH, J.E. Identification of the dominant cyst antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. **100**: 389-392, 1990.
- ZHANG, Y.W. & SMITH, J. *Toxoplasma gondii*: identification and characterization of a cyst molecule. **Experimental Parasitology**. **80**: 228-233, 1995.
- ZINKERNAGEL, R.M., EHL, S., AICHELE, P., OEHEN, S., KUNDIG, T. & HENGARTNER, H. Antigen localization regulates immune responses in a dose-and-time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. **Immunological Reviews**. **156**: 199-209, 1997.