



1000201905

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia

Curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**MASTÓCITOS DE *Calomys callosus* E *Toxoplasma gondii*: UMA ABORDAGEM *in vivo* E *in vitro* DE UMA INFECÇÃO EXPERIMENTAL**

*Gabriela Lícia Santos Ferreira*

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte de obtenção do título de Mestre.

**Uberlândia**

**Fevereiro – 2001**

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia  
Curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

MON  
616-2933  
F383m  
TES/MEM

**MASTÓCITOS DE *Calomys callosus* E *Toxoplasma gondii*: UMA ABORDAGEM *in vivo* E *in vitro* DE UMA INFECÇÃO EXPERIMENTAL**

*Gabriela Lícia Santos Ferreira*

*Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Alice Diniz dos Santos*

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte de obtenção do título de Mestre.

**Uberlândia**  
**Fevereiro – 2001**

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia  
Curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**MASTÓCITOS DE *Calomys callosus* E *Toxoplasma gondii*: UMA ABORDAGEM *in vivo* E *in vitro* DE UMA INFECÇÃO EXPERIMENTAL**

*Gabriela Lícia Santos Ferreira*

*Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Alice Diniz dos Santos*

*Co-Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo*

Dissertação apresentada ao  
Colegiado do Programa de Pós-  
graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como parte  
de obtenção do título de Mestre.

**Uberlândia**  
**Fevereiro – 2001**

# **MASTÓCITOS DE *Calomys callosus* E *Toxoplasma gondii*: UMA ABORDAGEM *in vivo* E *in vitro* DE UMA INFECÇÃO EXPERIMENTAL.**

Dissertação defendida em 21 de fevereiro de 2001.

Resultado: Aprovada: Conceito A.

Banca Examinadora:

**Profº. Drª. Rossana Correa Netto de Melo**

UFJF-Juiz de Fora-MG

**Prof. Dr. José Roberto Mineo**

UFU-Uberlândia-MG

**Profº. Drª. Ana Alice Diniz dos Santos**

UFU-Uberlândia-MG

Orientadora

*Aos meus pais, Celso e Eusa, e  
irmãos, Elias Neto e Paulina, por  
serem um porto seguro nas  
aflições da vida.*

*À minha família, pelo carinho e  
incentivo constantes.*

*Especialmente, ao meu avô, Elias,  
que com aquele olhar sempre  
cheio de ternura, me deu o prazer  
de conhecer o amor de um avô.  
Vô, que saudade de você!!*

## **Agradecimentos Especiais**

### **À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Alice Diniz dos Santos**

Este não é o nosso primeiro trabalho e fico contente em acreditar que não será o último! Percebo a cada dia que ainda tenho muito o que aprender com você, com o seu profissionalismo. Você é uma pesquisadora que sabe a hora de falar e de calar, de ensinar e de aprender, de permitir caminhar só e de caminhar ao lado. Sua maneira de conduzir a vida, com clareza e dedicação, desperta em mim grande admiração e respeito. Muito obrigada!

### **Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo**

Além da competência exemplar como pesquisador, admiro sua maneira de orientar, seja quando nos adverte de alguma falha, ou quando nos incentiva, em momentos de desânimo, mostrando que o nosso trabalho tem valor.

## **Agradecimentos**

Agradeço:

Ao Nosso Pai pela perfeição da vida e pela inteligência que nos permite entender um pouquinho dessas maravilhas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloisa Amália Vieira Ferro, por me ajudar em vários momentos, mas principalmente pela credibilidade. Elô, não são 52,5 páginas de agradecimento, mas o meu obrigado caberia em mais.

Ao meu amigo Junão, Antônio Thomás Junior, por estar sempre disponível quando precisei da sua valiosa ajuda (e não foram poucas vezes); agradeço mais ainda a amizade (com seus momentos de alegrias e tristezas) e o convívio com os seus filhos e família.

À Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida de Souza e Deise Aparecida de Oliveira Silva pela maneira gentil de ensinar, pela disposição e determinação em transmitir o que sabem. Especialmente à Cida pelo grande auxílio no desenvolvimento dos experimentos *in vitro*.

Ao Hélgio Heinisch Werneck, agradeço com carinho todo o eficiente trabalho de ultra-microtomia e as palavras de apoio, pois são elas que nos sustentam em momentos difíceis.

À Juliana Gonzaga de Oliveira pela amizade, apoio e ajuda com a documentação fotográfica. Acredito que a vida nos ensina, nos modifica e nos une.

Às amigas Elizabeth Oliveira Miranda e Aurélia Gervásio pelo carinho especial que sinto por vocês.

Ao Prof. Dr. Silvio Favoreto Junior pelo auxílio e atenção.

Aos colegas do curso de Pós-graduação pela nossa convivência cheia de alegria e espírito crítico: Haydée, Jodi, Fernanda, Sinval, Waleska, Raquel, Juliana, João Carlos (Resíduo), Silvia e Luciana.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia pelos anos de convívio: Adriana, Marta, Hugo, Omar, Patrícia, Maria Aparecida, Guilherme, Simone, Ronaldo, Adriano, Alexandre, Gustavo, Andréia, Juninho, Max, Tiago, Flávia, Henrique, Érika e Mônica (que me auxiliou no gráfico).

À todos os professores do Laboratório de Imunologia e do curso de Pós-graduação.

À todos, professores e auxiliares, do Laboratório de Histologia que me receberam tão carinhosamente durante a confecção desta dissertação. Em especial à Juscélia e ao Rui por serem sempre atenciosos e prestativos.

Aos colegas do Laboratório de Histologia: Karine, Haroldo, Jaqueline, Ana Lígia, Rafael, Francisco Cláudio, Fernando, Marcelo e Walkíria agradeço especialmente à Karina, Karine e ao Rafael pela disposição em me ajudar.

Ao secretário da Pós-graduação, Neto, por nos auxiliar com a parte burocrática.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina, por ter aberto as portas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e a Márcia pelo auxílio na utilização do microscópio confocal.

As pessoas que não foram citadas, porém me ajudaram em algum momento com palavras de incentivo ou com seu trabalho.

**Apoio Financeiro: CNPq.**

## **Abreviações**

Ac: anticorpo

Ag: antígeno

ESA: antígenos excretados e secretados

FcR $\gamma^{-/-}$ : camundongos sem a subunidade  $\gamma$  no receptor Fc

FcR: receptor hetero-oligomérico que participa do complexo Ag/Ac

GAG: glicosaminoglicana

GM-CSF: fator estimulador de colônia macrófago-granulócito

GRA: antígeno de grânulo denso de *T. gondii*

IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$

IFN- $\gamma$ R: receptor de interferon- $\gamma$

Ig: imunoglobulina

IgER: receptor de imunoglobulina E

IgR: receptor de imunoglobulina

IL: interleucina

LTB4: leucotrieno B4

MHC: Complexo de Histocompatibilidade

mMCP-1: protease 1 de mastócito de camundongo

mMCP-9: protease 9 de mastócito de camundongo

NK: “natural killer” ou assassinas profissionais

NO: óxido nítrico

PBS: solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2

Rac/Rho: proteínas ligantes de GTP

RMCPI e II: protease I e II de mastócito de rato

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1- Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>2- Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>3- Revisão da Literatura.....</b>	<b>22</b>
3.1- Mastócitos.....	23
3.1.1- Histofisiologia dos mastócitos.....	30
3.2- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	37
3.2.1- Histórico e taxonomia.....	37
3.2.2- Morfologia.....	37
3.2.3- Citoesqueleto.....	40
3.2.4- Formas evolutivas e Ciclo Biológico.....	41
3.2.5- Vias de Infecção.....	43
3.2.6- Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	45
3.2.7- Resposta imune ao protozoário.....	46
3.3- Interação mastócito/ <i>Toxoplasma gondii</i> .....	49
<b>4- Material e Métodos.....</b>	<b>51</b>
4.1- Animais.....	52
4.2- Manutenção da cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i> e sua inoculação nos animais para os experimentos <i>in vivo</i> .....	52
4.3- Experimentos <i>in vivo</i> .....	53
4.3.1- Comportamento dos mastócitos após 48 horas de infecção por <i>T. gondii</i> . ....	53
4.3.1.1- Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	53
4.3.2- Cinética do comportamento dos mastócitos frente à infecção por <i>T. gondii</i> .....	55
4.3.3- Comportamento dos mastócitos após 12 horas de infecção por <i>T. gondii</i> . ....	55
4.4- Experimentos <i>in vitro</i> .....	56
4.4.1- Purificação dos mastócitos.....	56

4.4.2-	Interação mastócito/ <i>T. gondii</i> .....	57
4.4.3-	Imunocitoquímica da interação mastócito/ <i>T. gondii</i> .....	58
4.4.3.1-	Cultura de células e Suspensão celular.....	58
<b>5-</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>61</b>
5.1-	Experimentos <i>in vivo</i> .....	62
5.1.1-	Comportamento dos mastócitos após 48 horas de infecção por <i>T. gondii</i> . .....	62
5.1.1.1-	Orelha.....	62
5.1.1.2-	Fígado.....	63
5.1.1.3-	Íleo.....	63
5.1.1.4-	Linfonodo dorsal.....	64
5.1.1.5-	Linfonodo submandibular.....	65
5.1.2-	Variação do número de mastócitos frente à infecção por <i>T. gondii</i> .....	66
5.1.3-	Comportamento <i>in vivo</i> dos mastócitos após 12 horas de infecção por <i>T. gondii</i> .....	67
5.1.3.1-	Microscopia de Luz.....	67
5.1.3.2-	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	67
5.2-	Experimentos <i>in vitro</i> .....	68
5.2.1-	Interação mastócito/ <i>T. gondii</i> .....	68
5.2.2-	Imunocitoquímica de mastócitos e <i>T. gondii</i> .....	69
<b>6-</b>	<b>Documentação Fotográfica.....</b>	<b>71</b>
<b>7-</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>89</b>
<b>8-</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>97</b>
<b>9-</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>100</b>

*Aplicando eu o meu coração a conhecer a sabedoria,  
e a ver o trabalho que há sobre a terra....*

*Então vi toda a obra de Deus, que o homem não  
pode alcançar a obra que se faz debaixo do sol; por mais  
que trabalhe o homem para a buscar não achará; e, ainda  
que diga o sábio que a virá a conhecer, nem por isso a  
poderá alcançar.*

Eclesiastes, 8: 16-17

## Resumo

Em *Calomys callosus* estudaram-se: 1- os mastócitos do exudato peritoneal quanto ao número após infecção por *Toxoplasma gondii*; 2- as características ultra-estruturais de mastócitos peritoneais, da derme da orelha e linfonodos submandibular e dorsal de *C. callosus*; 3- o comportamento *in vivo* dos mastócitos de vários órgãos (orelha, íleo e linfonodos submandibular e dorsal) de *C. callosus* após 48 horas de infecção por *T. gondii* e, também, dos mastócitos do exudato peritoneal após 12 horas de infecção; 4- a capacidade invasiva dos taquizoítas de *T. gondii* em mastócitos do exudato peritoneal de *C. callosus* após 12 horas de infecção. Após 12 horas de infecção por *T. gondii* observou-se aumento na quantidade dos mastócitos do exudato peritoneal de *C. callosus*, o que sugere ocorrer, diferenciação de precursores de mastócitos presentes na cavidade peritoneal e migração de novos precursores para este local com posterior diferenciação. Os mastócitos peritoneais e os mastócitos da derme da orelha e dos linfonodos submandibular e dorsal de *C. callosus* apresentaram características ultra-estruturais semelhantes entre si exibindo inúmeros grânulos citoplasmáticos com conteúdo, em sua maioria, elétron-denso e homogêneo. Os mastócitos dos vários órgãos (orelha, íleo e linfonodos submandibular e dorsal) de *C. callosus* após 48 horas de infecção por *T. gondii* e os mastócitos do exudato peritoneal após 12 horas de infecção apresentaram, ultra-estruturalmente, alterações morfológicas acentuadas: grânulos citoplasmáticos com conteúdo pouco elétron-denso, fusão de grânulos citoplasmáticos, presença de canais intracitoplasmáticos com sinais indicativos de desgranulação, rompimento de membrana plasmática e conteúdo de grânulos no meio extracelular. Tais evidências sugerem que os mastócitos participam da resposta imune contra a infecção pelo *T. gondii*. Os taquizoítas inoculados na cavidade peritoneal, após 12 horas de infecção estavam, quase que na sua totalidade, intracelulares. Estes foram encontrados no interior de vários tipos celulares, inclusive, em mastócitos. No presente trabalho, descreve-se pela primeira vez o comportamento *in vivo* dos mastócitos frente à infecção pelo *T. gondii*.

## ABSTRACT

In *Calomys callosus* was studied: 1- the peritoneal exsudate mast cells, about its number in different times after *Toxoplasma gondii* infection, using chamber hemocytometer; 2- the ultrastructural characteristics on the mast cells of the peritoneal exsudate, ear's skin, submandibular and dorsal lymph nodes of the *C. callosus*; 3- the mast cells behaviour *in vivo* in several organs (ear, ileum, submandibular and dorsal lymph nodes) after 48 hours of *T. gondii* infection using ultrastructural methods and also of the peritoneal exsudate mast cells using ultrastructural and histological methods; 4- the invasion capacity of the *T. gondii* tachyzoites in peritoneal exsudate mast cells 12 hours after infection by a light and electron transmission microscopical; 5- interaction between mast cells and *T. gondii* *in vitro* using ultrastructural methods and assay/analysis imunofluorescent by a confocal microscopical. After 12 hours *T. gondii* infection we could see an increase in the amount of peritoneal exsudate mast cells, probably due a local proliferation and maturation of residing mast cells precursors. The mast cells from the exsudate peritoneal, ear's skin, submandibular and dorsal lymph nodes of the *C. callosus* has similar ultrastructural characteristics between each other showing several/accountable citoplasmatic granules with homogeneus and electron dense content, in its majority. The mast cells from several organs (ears, ileum and submandibular and dorsal lymph nodes) of the *C. callosus* after 48 hours *T. gondii* infection and the mast cells from the peritoneal exsudate after 12 hours *T. gondii* infection presented a deep ultrastructural morphological changes suggesting a desgranulation process: citoplasmatic granules with a content of a little electron dense, fusion of the citoplasmatic granules, intracitoplasmatic channels, plasmatic membrane rupture and content of granules in the extracellular enviroment. This results suggests that the mast cells belong to the immunological answer against *T. gondii* infection. The tachyzoites intraperitoneally inoculated after 12 hours infection were find almost in its totality inside many kind of cells, including mast cells. The peritoneal exsudate

mast cells of the *C. callosus* interation with parasites *in vivo* and presented morphological changes indicating desgranulation process, probably due this interation. This is the first work that describe the mast cell behaviour *in vivo* during the *T. gondii* infection.

# *Introdução*

## 1- Introdução

Mastócitos são células do tecido conjuntivo amplamente distribuídas pelo corpo das espécies de vertebrados já estudadas e a maioria localiza-se em áreas em contato direto com o meio externo. Eles são freqüentemente observados em íntima associação com nervos e vasos sanguíneos. Mastócitos são capazes de iniciar eventos inflamatórios através da liberação de mediadores pré-formados incluindo histamina, serotonina, proteinases e proteoglicanas e a produção *de novo* de mediadores lipídicos tais como leucotrienos, prostaglandinas e fator ativador de plaquetas (MARSHALL et al., 1990). A liberação de mediadores pode ser induzida por ampla variedade de estímulos, incluindo antígenos, neuropeptídeos e componentes do sistema complemento.

Os mastócitos de mamíferos expressam características comuns, incluindo receptores na membrana plasmática para anticorpos da classe IgE, grânulos citoplasmáticos contendo aminas biogênicas, proteoglicanas e proteases neutras. Contudo, populações de mastócitos mostram diferenças fenotípicas em locais anatômicos distintos e este fenômeno é conhecido como heterogeneidade de mastócitos (BEFUS et al., 1986; GALLI, 1987; SANTOS & MACHADO, 1994; CHIARINI-GARCIA et al., 2000). Em roedores, mastócitos de mucosa e mastócitos de tecido conjuntivo contêm diferentes proteoglicanas, distinguidas através de métodos histoquímicos (ENERBACK, 1966 a, b; 1986).

Em mamíferos eutérios, os mastócitos apresentam grande heterogeneidade fenotípica, histoquímica, bioquímica e funcional possivelmente devido a: existência de linhagens distintas de mastócitos; processos celulares de maturação e diferenciação; estado funcional da célula e influência de fatores do microambiente (GALLI, 1986).

Nos últimos anos, acumulam-se evidências reconhecendo que mastócitos de roedores podem ser fonte de grande número de citocinas, incluindo: interleucinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6); fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF); fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e intérferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Expressão

de algumas destas citocinas também ocorre em humanos. Estas observações têm aumentado o interesse sobre os mastócitos como elemento imunorregulador nos tecidos e têm inspirado estudos de outros papéis para estas células na defesa e doenças inflamatórias (MARSHALL & BIENENSTOCK, 1994; MOTA, 1995).

Vários estímulos podem induzir os mastócitos a liberarem mediadores biologicamente ativos. Estes incluem: antígenos específicos em sua superfície (se os mastócitos foram, previamente, sensibilizados apresentando anticorpos da classe IgE ligados a receptores da membrana plasmática dos mesmos), produtos sintetizados durante a ativação do complemento, várias substâncias básicas, incluindo algumas derivadas de leucócitos e venenos de animais, certos neuropeptídeos e muitos agentes físicos, por exemplo: injúria mecânica, calor e frio (GALLI, 1987).

A hiperplasia de mastócitos algumas vezes associada a helmintiases intestinais faz com que os mastócitos sejam considerados células efetoras e/ou reguladoras na expulsão de certos parasitas intestinais mediada pelo sistema imune (NAWA, 1994). Mastócitos podem ainda desenvolver papel na patofisiologia observada na anafilaxia e em outras doenças alérgicas. Após ativação IgE/Ag mastócitos podem produzir múltiplas citocinas e suportar estratégias imunológicas contra parasitas. Em camundongos, os mastócitos da medula óssea ativados por ionomicina, IgE/Ag ou pelo mediador pró-inflamatório IL-1 $\alpha$  ou  $\beta$  produzem IL-3, IL-5, IL-6 e IL-9 assim como TNF- $\alpha$ , citocinas implicadas em muitos processos inflamatórios incluindo aqueles associados a alergias e infecções helmínticas (HULTNER et al., 2000).

Mastócitos participam da resposta imune contra vários parasitas: *Schistosoma mansoni*, *Giardia lamblia*, *Strongyloides venezuelensis*, *Trichuris muris*, *Trichinella spiralis* (LOZZI et al., 1996; HARDIN et al., 1997; ONAH et al., 2000; RICHARD et al., 2000; FRIEND et al., 2000). Além desses, HENDERSON & CHI (1998) estudaram *in vitro* o comportamento dos mastócitos frente à infecção por *T. gondii*.

*Toxoplasma gondii* é um parasita obrigatoriamente intracelular descrito em dois importantes laboratórios: Instituto Biológico de São Paulo (SPLENDORE,

1908) em coelhos e Instituto Pasteur de Tunis (NICOLLE & MANCEUX, 1908) em um roedor do norte da África, o *Ctenodactylus gondi*, o qual deu origem ao nome da espécie (PFEFFERKON, 1990). *T. gondii* é um dos parasitas protozoários mais abundantes no mundo: aproximadamente 25% da população global humana está, cronicamente, infectada (DUBEY, 1997), é cosmopolita e se desenvolve nos mais diversos tipos celulares de mamíferos e até mesmo em alguns tipos de invertebrados (WERK, 1989). O sucesso do parasitismo deste protozoário se deve a rapidez em invadir as células, utilizando receptores altamente conservados entre espécies filogeneticamente distantes, tornando praticamente todos os animais susceptíveis a se comportarem como hospedeiros intermediários e disseminadores do parasita (WERK, 1989; BUCKLEY, 1973). O *T. gondii* possui três formas evolutivas: os taquizoítas, os bradizoítas e os esporozoítas e sua infecção não é percebida em pessoas imunocompetentes, pois a maioria das vezes é assintomática.

Os抗ígenos secretados e excretados (ESA) por *T. gondii*, geram respostas imunitárias específicas (DARCY et al., 1988). O estudo da patogênese da infecção experimental por *T. gondii* deve considerar os diversos fatores conhecidos que podem influenciar o padrão da resposta imune do hospedeiro frente ao parasita. Entre estes podemos citar: o sexo, a presença de hormônios (WALKER et al., 1997), a linhagem do animal e a sua bagagem genética. Tais fatores podem conferir ou não resistência ao parasita (BROWN et al., 1997).

O gênero *Calomys* é composto por roedores da família Cricetidae, amplamente, encontrados nas Américas Central e do Sul em diferentes tipos de biomas como em floresta tropical, savana, caatinga, pastagem e área urbana (MELLO, 1981). A biologia desses animais bem como sua adaptação às condições laboratoriais foram estudadas por diversos autores (PETTER et al., 1967; JUSTINES & JOHNSON, 1970; MELLO, 1981).

*Calomys callosus* são animais considerados importantes em relação à saúde pública, uma vez que participam da epidemiologia de algumas zoonoses, por exemplo, como reservatório do *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO, 1973), agente etiológico da doença de chagas e transmissores da febre hemorrágica argentina (JUSTINES & JOHNSON, 1969. Também estes animais têm-se mostrado bastante

suscetíveis a doenças infecciosas tais como a esquistossomose, leishmaniose e toxoplasmose (FAVORETO et al., 1994). FAVORETO et al. (1998) afirmam que *C. callosus* podem ser classificados como animais, altamente sensíveis à infecção por *T. gondii* e os consideram um excelente modelo experimental para se estudar a fase aguda da infecção por *T. gondii*. Deve-se ressaltar ainda que não há relatos, na literatura consultada, sobre qualquer trabalho envolvendo mastócitos de *C. callosus*, motivo que torna interessante o estudo morfológico e comportamental dessas células.

Sabe-se que o principal mecanismo de eliminação de parasitas intracelulares, particularmente o *T. gondii*, é uma apresentação de resposta imune do tipo Th1 pelo hospedeiro que leva a produção das citocinas IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (GAZZINELLI et al., 1991; HENTER et al., 1995). Os macrófagos são fundamentais na eliminação do parasita. A secreção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-12, o estímulo de células NK que leva a produção de INF- $\gamma$  por células T e a secreção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase são alguns dos mecanismos de combate do hospedeiro, fundamentais na eliminação do parasita (KERSTEN et al., 1997).

Após a interação *in vitro* entre mastócito/*Toxoplasma gondii* estas apresentaram-se com acentuadas alterações morfológicas (HENDERSON & CHI, 1998). Sendo este o único trabalho, na literatura consultada, que relata a participação *in vitro* dos mastócitos frente a infecção por *T. gondii*, pouco se sabe sobre o papel dos mastócitos nesta infecção, tornando-se atraente realizar estudos pormenorizados sobre o comportamento *in vivo* e *in vitro* dos mastócitos frente à infecção aguda por *T. gondii*.

# *Objetivos*

## 2- Objetivos

- 2.1- Avaliar quantitativamente o número de mastócitos do exudato peritoneal de *Calomys callosus* infectados por *Toxoplasma gondii* durante período de 48 horas após a infecção, utilizando-se microscopia de luz;
- 2.2- Descrever as características ultra-estruturais de mastócitos peritoneais e de diferentes órgãos (derme da orelha e linfonodos submandibular e dorsal) de *C. callosus*;
- 2.3- Descrever o comportamento *in vivo* dos mastócitos de vários órgãos (orelha, íleo e linfonodos submandibular e dorsal) de *C. callosus* após 48 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*, através da microscopia eletrônica de transmissão;
- 2.4- Observar a ocorrência de parasitismo na orelha, fígado, íleo e linfonodos submandibular e dorsal de *C. callosus*, após 48 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*, através da microscopia eletrônica de transmissão;
- 2.5- Descrever o comportamento *in vivo* dos mastócitos do exudato peritoneal de *C. callosus*, após 12 horas de infecção por *T. gondii*, através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão;
- 2.6- Estudar a capacidade invasiva dos taquizoítas de *T. gondii* em mastócitos do exudato peritoneal de *C. callosus*, após 12 horas de infecção *in vivo*;
- 2.7- Analisar o comportamento *in vitro* dos mastócitos do exudato peritoneal de *Calomys callosus* na presença do *T. gondii*, através de microscopia eletrônica de transmissão e de imunocitoquímica, em vários intervalos de tempo após infecção (0, 30 e 60 minutos).

# *Revisão da Literatura*

### 3- Revisão da Literatura

#### 3.1- Mastócitos

Em 1878 Paul Ehrlich chamou os mastócitos de “mastzellen” (well-fed cells) o que significa células bem alimentadas, por causa dos grânulos proeminentes no seu citoplasma e sugeriu que estas células pudessem manter a nutrição do tecido conjuntivo. Alguns anos depois Elie Metchnikoff (1892) foi, provavelmente, o primeiro a sugerir que mastócitos tivessem uma função fagocítica e talvez contribuíssem para a defesa do hospedeiro.

Mastócitos são amplamente distribuídos na mucosa intestinal, pele, sangue, vasos linfáticos e em muitos outros tecidos e órgãos (GALLI, 1987; MOTA, 1995), ou seja, pelo corpo das espécies de vertebrados já estudadas (SOTER, 1983). São particularmente abundantes em áreas que entram em contato direto com substâncias exógenas, em associação com vasos sanguíneos e linfáticos, dentro e próximos de nervos periféricos, e em certas espécies dentro das cavidades pleural e peritoneal. Portanto, os mastócitos podem interagir com células e elementos de vários tecidos, órgãos e cavidades do corpo. Os mastócitos também participam das respostas de reações de hipersensibilidade imediata na pele (SOTER, 1983). Atualmente, sabe-se que os mastócitos constituem população heterogênea de células com propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais variando entre espécies e dentro de uma mesma espécie (CHIU & LAGUNOFF, 1972; BIENENSTOCK et al., 1987).

Morfologicamente, os mastócitos são divididos em duas subpopulações: os mastócitos de tecido conjuntivo e os mastócitos de mucosa. A primeira encontra-se geralmente em volta dos vasos e é constituída de células grandes com um citoplasma cheio de grânulos. A segunda subpopulação se restringe às mucosas, por exemplo do trato digestório e respiratório, e contém menor quantidade de grânulos, que algumas vezes são maiores (MACEDO, 1989). A separação de populações de mastócitos restrita a dois fenótipos (mastócitos de mucosa e mastócitos de tecido

conjuntivo) sugerida por ENERBACK (1966a, b, c) tem sido questionada pela observação de que mastócitos de tecido conjuntivo de vários locais (peritônio, mesentério, pulmão, linfonodos e pele) exibem variações acentuadas na morfologia e em suas propriedades histoquímicas e funcionais em resposta a vários agentes (composto 48/80, poliarginina, polilisina, polimixina B, substância P, ACTH, mastoparan, sulfato de protamina e histona). Essas observações confirmam a existência de heterogeneidade fenotípica (TAINSH & PEARCE, 1992; CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992; SANTOS, 1996; CHIARINI-GARCIA et al., 2000) e realçam o uso inapropriado dos termos mastócitos de mucosa e mastócitos de tecido conjuntivo que representam dois fenótipos extremos.

A heterogeneidade é um dos tópicos mais estudados e discutidos em relação aos mastócitos (revisões em GALLI, 1987; GLEICH et al., 1986; ENERBACK, 1986; CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992; CHIARINI-GARCIA, 1995; SANTOS & MACHADO, 1994; SANTOS, 1996). Estes estudos se intensificaram a partir de 1966 quando Enerback, estudando a mucosa intestinal de ratos detectou a presença de um tipo celular característico, denominado mastócito de mucosa. A heterogeneidade dos mastócitos de mucosa em relação aos mastócitos de tecido conjuntivo, baseia-se nos efeitos da fixação (ENERBACK, 1966a), nas propriedades de coloração (ENERBACK, 1966b), na resposta frente ao composto 48/80 (ENERBACK, 1966c), na sua capacidade de armazenar aminas (ENERBACK, 1966d), nas propriedades histoquímicas, na reatividade a secretagogos, no tipo de proteases dos grânulos e também na dependência de fatores de crescimento (NAWA et al., 1994).

Observa-se que, em mamíferos eutérios, os mastócitos apresentam grande heterogeneidade fenotípica e funcional possivelmente devido a: existência de linhagens distintas de mastócitos; processos celulares de maturação e diferenciação; estado funcional da célula e influência de fatores do microambiente (revisão em GALLI, 1986).

A heterogeneidade pode, ainda, estar de acordo com a determinação da natureza de proteoglicanas e de detecções imunocitoquímicas e histoquímicas de enzimas proteases serinas neutras, quimases e triptases. Mastócitos de mucosa e

mastócitos de tecido conjuntivo de ratos podem ser discriminados por diferenças antigênicas de suas quimases, RMCPII e RMCPI, respectivamente. No caso de mastócitos humanos, células que reagiram positivamente para triptase e quimase foram vistas principalmente na pele e submucosa intestinal e células positivas para triptase foram, predominantemente, vistas no pulmão e na mucosa intestinal. Estas células foram, porém, negativas nos mastócitos da língua assim como nos mastócitos da pele (NAWA et al., 1994).

NAWA et al. (1994) estudando os gerbis da Mongólia observou que eles também possuem os dois subtipos de mastócitos, mastócitos de mucosa e mastócitos de tecido conjuntivo, os quais podem ser discriminados por meio de morfologia ultra-estrutural e também por demonstração de proteases serinas neutras. Porém, diferente de outros animais, eles não podem ser discriminados por métodos histoquímicos convencionais para proteoglicanas nem para a reatividade a secretagogos. Tais características únicas de subtipos de mastócitos de gerbis da Mongólia poderiam dar valiosas informações sobre a filogenia dos mastócitos.

A partir da década de 80, os estudos sobre mastócitos direcionaram-se, principalmente, para a determinação de fatores do microambiente capazes de influenciar o fenótipo e a função dessa célula (GALLI, 1990, 1993; SWIETER et al., 1992), bem como para fatores que determinassem sua diferenciação (KITAMURA & FUJITA, 1989). Sabe-se, que os mastócitos têm origem na medula óssea (KITAMURA et al., 1987a) e que células precursoras de mastócitos, não identificáveis morfológicamente, migram pela corrente sanguínea, invadem os tecidos conjuntivos, proliferam e diferenciam-se em mastócitos. O microambiente, onde se alojam precursores ou são inoculados mastócitos já diferenciados, é decisivo para a expressão ou manutenção de um dado fenótipo (revisões em MILLER, 1980; KITAMURA et al., 1987a,b). Nos linfonodos abdominais do gambá *Didelphis albiventris*, há populações de mastócitos morfológicamente diferentes (SANTOS, 1996). A bioquímica dos diversos microambientes é ainda desconhecida. No entanto, já se constatou a existência de diversos fatores solúveis que promovem a proliferação e diferenciação de mastócitos, como as IL-3 e IL-4 produzidas por linfócitos T (GINSBURG et al., 1981; NABEL et al., 1981; SMITH

& RENNICK, 1986; MOSMANN et al., 1986; revisão em KITAMURA et al., 1987a, b). Mastócitos derivados da medula óssea, por cultura de células progenitoras hematopoiéticas em meio contendo células T ativadas por lectina, foram estudados e descobriu-se que a citocina que induz o crescimento preferencial e a diferenciação de células progenitoras para mastócitos é a IL-3, mas a IL-4 pode agir sinergisticamente com IL-3 para aumentar o crescimento de mastócitos (STEVENS & AUSTEN, 1989).

A freqüência de precursores da medula óssea não sofre mudança, porém a freqüência dos precursores do sangue, do baço e do intestino mudam. O aumento da freqüência de precursores do intestino de camundongos com timo foi precedido de aumento das freqüências no sangue e baço. Em camundongos nude tais mudanças na freqüência dos precursores não ocorrem, indicando que células T ou produtos de células T estão envolvidos na regulação desse fenômeno. Precursores de mastócitos de mucosa também podem ser atraídos do sangue para o intestino por outros fatores locais como抗ígenos ou fatores de células T, tais como IL-3. Os mastócitos de mucosa respondem a *T. spiralis* e a outros helmintos devido a proliferação local e maturação de precursores de mastócitos, esta resposta é amplificada pelo influxo de células precursoras do sangue para o intestino, e ambos fenômenos são dependentes de células T (PARMENTIER et al., 1987).

Estudos ultra-estruturais mostram também heterogeneidade entre mastócitos da mesma e de várias espécies (rato, cobaio, cão, homem e gambá) quanto ao tamanho, à forma e ao conteúdo de seus grânulos (BEHRENDT et al., 1978; KRUGER, 1984; FOX et al., 1985; SANTOS & MACHADO, 1994; CHIARINI-GARCIA et al., 2000). Contudo não há na literatura consultada qualquer estudo sobre mastócitos de *Calomys callosus*. Enquanto que os grânulos dos mastócitos de ratos são maiores que os do cobaio e do homem, que por sua vez são maiores que os do cão. A forma de cesta é uma característica dos grânulos de mastócitos de cobaio e de gambá. Esta forma é freqüente no cão, menos freqüente no homem e ausente no rato. Quanto ao aspecto, à microscopia eletrônica de transmissão, os grânulos dos mastócitos de rato são moderadamente uniformes, os de cão, finamente granulosos e os de cobaio podem ser homogeneamente elétron-densos, fina ou grosseiramente

granulosos, mas a maioria exibe estruturas lamelares e espiraladas características. A variação na estrutura dos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos é, em parte, conseqüência das alterações sofridas durante sua formação (LAGUNOFF, 1972; SANTOS & MACHADO, 1994) e durante a ativação da célula (KRUGER, 1984).

Vários estímulos podem induzir os mastócitos a liberarem mediadores biologicamente ativos. Estes incluem: antígenos específicos em sua superfície (se os mastócitos foram, previamente, sensibilizados apresentando anticorpos da classe IgE ligados a receptores da membrana plasmática dos mesmos), produtos sintetizados durante a ativação do complemento, várias substâncias básicas, incluindo algumas derivadas de leucócitos e venenos de animais, certos neuropeptídeos e muitos agentes físicos (por exemplo: injúria mecânica, calor e frio). Embora alguns destes agentes provoquem a liberação de mediadores pela destruição dos mastócitos, muitos causam a liberação de mediadores sem dano detectável da célula (GALLI, 1987).

Os mastócitos podem ser ativados para liberar mediadores inflamatórios via imunoglobulina E dependente ou por mecanismos independentes de IgE. Nos mecanismos IgE independentes os mastócitos podem ser ativados por substâncias como ionóforo de cálcio, composto 48/80, substância P e produtos microbianos. Eles podem liberar potentes mediadores inflamatórios e executar um papel pivô na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas. As defesas são dependentes de mastócitos que produzem TNF- $\alpha$ , que atrai e ativa neutrófilos no sítio de infecção (CALDERÓN et al., 1998).

Em doenças alérgicas, uma série de eventos patobiológicos tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e infiltração leucocitária, ocorrem na região acometida. Estes eventos são iniciados por uma ativação imunológica dos mastócitos, através da ligação do alérgeno à imunoglobulina IgE ligada à sua superfície (revisão em LEWIS & AUSTEN, 1981). Esta interação Ag-IgE age sobre o sistema adenil-ciclase-AMPc provocando uma série de eventos no mastócito, que culminam com a extrusão dos grânulos citoplasmáticos (AUSTEN, 1984). Assim, mediadores são liberados e exercem suas funções. Tais mediadores podem ser divididos em duas classes: aqueles que são pré-

formados e estocados nos grânulos dos mastócitos e aqueles que são sintetizados após a ativação dos mastócitos (PEARCE, 1986). Os mediadores pré-formados e estocados compreendem aminas (histamina e serotonina), proteases (carboxipeptidases e proteases neutras), outras enzimas (arilsulfatase, peroxidase, beta-hexosaminidase), fatores quimiotáticos (para eosinófilos e neutrófilos), e as proteoglicanas: heparina e sulfato de condroitina (revisão em LEE et al., 1986; PEARCE, 1986). Como exemplos de mediadores sintetizados após a ativação dos mastócitos podemos citar os eicosanoides: leucotrienos e prostaglandinas e o fator ativador de plaquetas (MARSHALL et al., 1990). A presença e concentração de cada um destes mediadores, varia conforme a espécie e em tecidos diferentes na mesma espécie (PEARCE, 1986; STEVENS & AUSTEN, 1989); assim como entre as espécies. O exemplo clássico refere-se à serotonina que, em roedores (AUSTEN, 1984) e no gambá *Didelphis albiventris* (MACHADO, 1980), é um dos constituintes dos grânulos. Ainda, a heparina presente nos grânulos dos mastócitos da mucosa do íleo do gambá *D. albiventris* (SANTOS & MACHADO, 1994).

Em trabalhos experimentais várias substâncias têm sido usadas para estudo dos processos de desgranulação dos mastócitos. Entre elas: peptídeo 401 do veneno de abelha (PEARCE, 1982; SHANAHAN et al., 1984; PEARCE et al., 1986), ionóforo de cálcio A23187 (KAZIMIERCZAK et al., 1978; CHURCH et al., 1982), polimixina B (LAGUNOFF, 1972), carbacol (DIMITRIADOU et al., 1990) e o composto 48/80 (ENERBACK, 1966c; BIENENSTOCK et al., 1982; LEE et al., 1986). O efeito dessas drogas é muito variável entre as espécies e mesmo em mastócitos de diferentes tecidos de uma mesma espécie (PEARCE, 1982).

Os mastócitos desenvolvem um papel pivô, não apenas nas reações alérgicas mas também em desordens inflamatórias. Após ativação imunológica via receptor de IgE (IgER) há a liberação pelos mastócitos de uma variedade de citocinas, mediadores derivados de lipídeos, aminas, proteases e proteoglicanas. Todos podem regular células adjacentes e o metabolismo da matriz extracelular de tecidos conjuntivos (STEVENS & AUSTEN, 1989).

Sabe-se que o processo da liberação do conteúdo dos grânulos dos mastócitos pode ocorrer através de dois mecanismos básicos: desgranulação gradual

(peacemeal) quando há liberação de produtos estocados sem extrusão dos grânulos citoplasmáticos (ENERBACK & LOWHAGEN, 1979; FRIEDMAN & KALINER, 1988; DIMITRIADOU et al., 1990; KOPS et al., 1990); e a desgranulação anafilática quando ocorre fusão dos grânulos entre si e destes com a membrana plasmática, ocorrendo solubilização e eliminação dos produtos estocados (ROHLICH et al., 1971; ASKENASE, 1980; FRIEDMAN & KALINER, 1988).

Após estimulação com anti-IgE ou substância P, mastócitos isolados de pulmão humano e de roedores, assim como de biópsias de pele, mostram fusão de membranas de grânulos entre si e com a membrana plasmática, estabelecendo-se comunicação entre as matrizes dos grânulos e o espaço extracelular. Essas fusões formam grandes labirintos ou canais de desgranulação por onde os mediadores são liberados das células (CHURCH et al., 1991). Também, CAULFIELD et al. (1980) mostraram que a liberação de mediadores pré-formados dos mastócitos é acompanhada por alterações ultra-estruturais que incluem solubilização e clareamento do conteúdo dos grânulos, fusão intergranular e fusão de membranas perigranulares com a membrana plasmática para formar canais para o espaço extracelular.

RÖHLICH (1975) observou que mastócitos normais de rato fixados rotineiramente, apresentam microfilamentos de actina como constituintes regulares do citoplasma cortical. Sugeriu, ainda, que esses microfilamentos, possivelmente, estão envolvidos na exocitose dos grânulos dos mastócitos. Posteriormente, imagens tri-dimensionais mostram a presença de uma rede subplasmalêmica e perigranular de microfilamentos (NIELSEN & JAHN, 1984). A existência de microfilamentos de actina em mastócitos também foi relatada por TASAKA et al. (1986). Nas células em repouso, a imunofluorescência para actina mostra reação circundando cada grânulo. Após estimulação com secretagogos, a distribuição de microfilamentos de actina torna-se muito irregular e desordenada. Essas observações indicam que filamentos de actina localizados sob a membrana plasmática, provavelmente, participam do processo de exocitose (TASAKA et al., 1986; TASAKA et al., 1988; MIO & TASAKA, 1989). Os filamentos de actina ligados aos grânulos dos mastócitos exercem um papel importante não somente para

a extrusão, mas também para a recuperação de grânulos exocitados (MIO & TASAKA, 1989). Os microfilamentos de actina podem ser rompidos pela toxina A de *Clostridium difficile*, esta alteração pode reduzir a capacidade de liberação de histamina dos grânulos dos mastócitos. As toxinas A e B de *C. difficile* alteram o citoesqueleto pela monoglicosilação das proteínas ligantes de GTP: Rho e Rac. Tais proteínas têm mostrado regular o papel do citoesqueleto durante a secreção de mediadores inflamatórios em mastócitos (CALDERÓN et al., 1998).

### **3.1.1- Histofisiologia dos mastócitos**

A hiperplasia de mastócitos algumas vezes associada a helmintíases intestinais faz com que os mastócitos sejam considerados células efetoras e/ou reguladoras na expulsão de certos parasitas intestinais mediada pelo sistema imune (NAWA, 1994).

Os mastócitos participam da defesa do hospedeiro contra parasitas e possuem atividade citotóxica contra algumas células-alvo como: células tumorais e esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*. São capazes de liberar leucotrienos que são produtos do ácido araquidônico conhecidos por participarem dos processos inflamatórios (HENDERSON & CHI, 1998). Os mastócitos podem ainda agir em conjunto com os eosinófilos, como ocorre na destruição das larvas de *S. mansoni*. Os抗igenos destas larvas causam a liberação dos grânulos dos mastócitos, de forma IgE-dependente, e também a liberação de quimiotáticos capazes de atrair, seletivamente, os eosinófilos (HENDERSON & CHI, 1998).

Protozoários *Eimeria* são parasitas intracelulares, preferencialmente, de células epiteliais do trato intestinal que desencadeiam mudanças patológicas no intestino delgado similares a aquelas induzidas por infecções a helmintos. Em particular, a infecção de ratos por *Eimeria nieschulzi* ou pelo nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis* é caracterizada por um substancial aumento no número de mastócitos da mucosa intestinal (HUNTLEY et al., 1985).

A protease II dos mastócitos de rato (RMCPII) é liberada na circulação sanguínea de ratos com infecção primária pelo nematódeo intestinal *N. brasiliensis* e reinfetados por vermes homólogos ou por抗ígenos do verme e também durante a infecção por *Eimeria*. A secreção sistêmica máxima de RMCPII, em ratos infectados por *E. nieschulzi* ocorre no nono (9º) dia de infecção, precedido por uma acumulação máxima de mastócitos de mucosa. Trabalhos com *N. brasiliensis* e *T. spiralis* fazem uma associação temporal entre a secreção máxima de RMCPII e a expulsão dos vermes do intestino, indicando um potencial papel funcional para mastócitos de mucosa na imunidade contra nematódeos (HUNTLEY et al., 1985). RMCPII tem atividade proteolítica contra colágeno tipo IV da membrana basal e seu efeito durante a infecção por nematódeos pode estar ligado ao aumento da permeabilidade da mucosa permitindo a translocação dentro do lúmen de fatores do sistema imune como anticorpos e moléculas do complemento (HUNTLEY et al., 1985).

A liberação sistêmica de proteinases de mastócitos durante infecção primária e desafios com nematódeo *Strongyloides venezuelensis* tem sido descrita em roedores e carneiros e citada como evidências de que mastócitos são ativos durante a expulsão do nematódeo. A expulsão de vermes adultos *S. venezuelensis* em quatro espécies diferentes de hamsters está associada com a presença de mucinas altamente sulfatadas. Proteoglicanas de alto peso molecular, pré-formadas em grânulos de mastócitos de camundongos, como condroitina e heparina são também altamente sulfatadas sugerindo que estas possam ser as moléculas efetoras na prevenção do estabelecimento e subsequente expulsão de adultos *Strongyloides*. Além disso, o tratamento de camundongos com vários carboidratos incluindo glicosaminoglicanas produzidas por mastócitos como sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina E, heparina e dextran sulfato demonstra que estas moléculas participam da expulsão do verme *S. venezuelensis* em camundongos, pela inibição da ligação de moléculas de adesão do parasita às células epiteliais. A deleção da subunidade Fcγ resulta na perda da função dos mastócitos, incluindo desgranulação e liberação de conteúdo granular, sendo assim é possível que o defeito na expulsão do verme após a infecção primária por *S. venezuelensis* em camundongos sem a subunidade γ (FcR $\gamma^-$ ) resulte

da falta da desgranulação dos mastócitos e liberação de proteoglicanas sulfatadas de alto peso molecular (ONAH et al., 2000).

Os receptores Fc (FcR) são complexos hetero-oligoméricos presentes na maioria das células efetoras do sistema imune, e suas ligações (complexo Ag/Ac) promovem a fagocitose, a citotoxicidade celular mediada pelo Ac, a ativação de células inflamatórias e muitas outras respostas efetoras. Os FcR ligam-se aos抗ígenos desencadeando uma transdução de sinais no interior celular que requer a subunidade homodimérica  $\gamma$ . A disrupção desta subunidade resulta em defeitos pleiotrópicos na função da célula. O mecanismo exato pelo qual mastócitos participam da expulsão do parasita não é muito claro, e mesmo assim sugere-se que os grânulos liberados, de mastócitos ativados, sejam as últimas moléculas efetoras da expulsão. Embora seja claro que a deleção FcR $\gamma$  não interfere com a mastocitose da mucosa seguindo a infecção primária por *Strongyloides venezuelensis*. Deve-se notar que a hiperplasia de mastócitos não é por si só responsável pela expulsão do verme, e que a participação dos mastócitos na expulsão do verme envolve um mecanismo efetor que pode ser afetado pelo rompimento da subunidade  $\gamma$  (ONAH et al., 2000). A deficiência na subunidade FcR $\gamma$  resulta em um aumento significante no número de ovos por gramas de fezes, no número de vermes e na expulsão do verme, mas não tem nenhum efeito na liberação de MMCP-1 no soro (ONAH et al., 2000).

O fator IFN- $\gamma$  pode influenciar as reações de hipersensibilidade e outros processos dependentes de mastócitos como causar a inibição da desgranulação de mastócitos mediada pela IgE e da citotoxicidade mediada pelo TNF- $\alpha$  além de causar a proliferação clonal de mastócitos de tecido conjuntivo de roedores. IFN- $\gamma$  liberado de células T e de células NK desempenha também várias atividades inflamatórias e imuno regulatórias, incluindo a promoção da diferenciação de células para perfil de resposta imune Th1, estimulação de moléculas MHC, ativação de macrófagos e estimulação da expressão da forma induzida de NO sintase (tipo II) (BROOKS et al., 2000).

Macrófagos ou outras células acessórias da cavidade peritoneal podem inibir a desgranulação de mastócitos e basófilos peritoneais de roedores em decorrência da

síntese de NO induzida pela presença de IFN- $\gamma$ , porém, esta inibição é indireta, ou seja IFN- $\gamma$  não ataca os mastócitos diretamente para inibir a sua desgranulação. A inibição ocorre apenas quando células acessórias expressam o IFN- $\gamma$ R, impedindo a liberação de serotonina dos mastócitos e induzindo a síntese de NO (BROOKS et al., 2000). A ligação de IFN- $\gamma$  ao mastócito se dá pelos resíduos de glicosaminoglicanas (GAGs) presentes em sua superfície, e não pelo IFN- $\gamma$ R. BROOKS et al. (2000) demonstraram, pela primeira vez, que sulfato de dermatan na superfície de mastócitos pode se ligar a IFN- $\gamma$  e apresentá-lo a macrófagos, induzindo uma resposta imunológica importante. Sulfato de condroitina também tem sido implicado na biologia de outras citocinas e fatores de crescimento já que o sulfato de condroitina B liga-se a IL-7, IL-12, IL-6, IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  e ao fator de crescimento de hepatócito humano; promove a função do fator de crescimento de fibroblastos 2 e auxilia a heparina na sua atividade regulatória do peptídeo IFN- $\gamma$ . O fato das citocinas e fatores de crescimento poderem se ligar a GAGs tem um profundo significado funcional: GAGs podem sequestrar citocinas e fatores de crescimento do fluido extracelular, providenciando um mecanismo de regulação destes mediadores. As GAGs podem, ainda, se ligar a múltiplas moléculas concentrando tais fatores no mesmo microambiente, possibilitando desta maneira a ativação de diferentes receptores e no caso do fator de crescimento de fibroblasto a interação GAG/sulfato de heparan é um pré-requisito para a entrega do sinal estimulatório de crescimento. BROOKS et al. (2000) relatam também que mastócitos agindo como um reservatório de conteúdo funcionalmente ativo de IFN- $\gamma$ , têm implicações nas atividades biológicas desta citocina, no seu papel durante a inflamação, na imunidade e no entendimento de interações célula-célula durante as respostas imunes (BROOKS et al., 2000).

A giardíase tem sido associada com o aumento de doenças alérgicas e com uma alteração na função imune da mucosa. O transporte macromolecular *in vivo* e *in vitro* do jejun, a permeabilidade epitelial e a contagem dos mastócitos de mucosa e dos mastócitos de tecido conjuntivo foram examinados em gerbis da Mongólia inoculados orogastricamente com a cepa patogênica de *Giardia lamblia*.

As observações indicam que durante a fase de pico da giardíase, a quantidade de抗ígenos ativos no jejuno está aumentada promovendo o recrutamento de mastócitos de mucosa e mastócitos de tecido conjuntivo. Tais mudanças desenvolvem um papel importante no aumento da incidência das reações de hipersensibilidade associadas com infecção por *Giardia*. O aumento das macromoléculas está associado à hiperplasia de mastócitos de mucosa e mastócitos de tecido conjuntivo vinte e um dias após a infecção, o momento no qual os trofozoítos estão presentes no lúmen intestinal e o transporte macromolecular retorna a níveis controláveis (HARDIN, 1997).

HARDIN et al. (1997) demonstraram ainda que o desafio oral crônico antigênico de animais sensibilizados por *Giardia lamblia* durante nove dias gera hiperplasia de mastócitos de mucosa, desgranulação destes mastócitos e aumento nos níveis de circulação de protease II (RMCPII) específica de mastócitos. Além disso, desafio antigênico crônico de ratos sensibilizados durante quatro semanas também induz hiperplasia de mastócitos de mucosa; e duas semanas após cessar o desafio nenhuma alteração nas contagens de mastócitos de tecido conjuntivo foi observada.

Desde que descobriu-se que as células relacionadas com o perfil de resposta imune Th2 produzem fator de crescimento de mastócitos, o papel fisiológico da IL-9 tem sido investigado. Elevada produção de citocinas Th2 em consequência da asma tem sido relacionada com a resistência a certas infecções parasitárias. IL-9, por exemplo, foi encontrada aumentando a resistência de camundongos infectados pelo nematódeo *Trichuris muris* no ceco. Esta resistência foi associada com altos níveis de IgE e IgG1 e com uma pronunciada mastocitose intestinal. Com base nestas observações, a inibição da atividade da IL-9 *in vivo* poderia, provavelmente, ser benéfica na asma e em infecções deletérias de parasitas. Para testar tais hipóteses RICHARD et al. (2000) avaliou a importância da IL-9 nestes processos e desenvolveu um método para induzir a produção de anticorpos anti-IL-9 *in vivo*. IL-9 secretada por células tumorais tem suas atividades suprimidas após vacinação com anticorpos anti-IL-9, pela inibição da ativação dos mastócitos e da eosinofilia consecutiva. Vacinação anti-IL-9 ainda permite o estudo das funções da IL-9 *in*

vivo. Respostas imunes a infecções parasitárias representam um atrativo sistema para avaliar a eficácia da vacinação com anticorpos anti-IL-9 pois a superprodução de IL-9 promove rápida eliminação do nematódeo *Trichuris muris* do ceco. Observou ainda que a vacinação com anticorpos anti-IL-9 pode prejudicar completamente a expulsão do verme demonstrando que esta citocina é necessária neste processo (RICHARD et al., 2000).

Camundongos infectados por *Schistosoma japonicum* são resistentes ao nematódeo *Strongyloides venezuelensis*. O número de adultos *S. venezuelensis* contados nos camundongos, após seis semanas de infecção por *S. japonicum*, foi显著mente diminuído. Números significantes de larvas de *S. venezuelensis* recuperadas do pulmão são eliminados durante três dias de camundongos infectados por *S. japonicum*, enquanto que os dados histológicos revelam que a infecção está associada com infiltração eosinofílica massiva nos pulmões. Além disso, adultos de vermes *S. venezuelensis* implantados no duodeno de camundongos infectados por *S. japonicum* não podem se estabelecer no intestino, este resultado está associado com a mastocitose na mucosa. Ativação de eosinófilos e mastócitos intestinais está correlacionada com a elevada expressão de mRNA de IL-3, IL-4 e IL-5 em camundongos infectados por *S. japonicum*. O soro de camundongos infectados por *S. japonicum* reconheceu fortemente抗ígenos de larvas de *S. venezuelensis* assim como são reconhecidos por soro de camundongos infectados pelo próprio *S. venezuelensis*, embora a transferência do soro de camundongos infectados por *S. japonicum* para camundongos normais não protegeu estes últimos quando foram infectados por *S. venezuelensis*. Os mecanismos de morte da larva e a expulsão dos vermes adultos de *S. venezuelensis* em camundongos infectados por *S. japonicum* são idênticos àqueles vistos em infecções apenas por *S. venezuelensis* (MARUYAMA et al., 2000).

Mastócitos podem ainda desenvolver papel na patofisiologia observada na anafilaxia e em outras doenças alérgicas dominadas pelo perfil de resposta imune Th2. Após ativação IgE/Ag mastócitos podem produzir múltiplas citocinas relacionadas com perfil Th2 e suportar estratégias imunológicas contra parasitas. Em camundongos os mastócitos da medula óssea ativados por ionomicina, IgE/Ag

ou pelo mediador pró-inflamatório IL-1 $\alpha$  ou  $\beta$  produzem IL-3, IL-5, IL-6 e IL-9 assim como TNF- $\alpha$ , citocinas implicadas em muitos processos inflamatórios incluindo aqueles associados a alergias e infecções helmínticas. IL-1 não induz significante liberação de citocinas na ausência da ionomicina ou IgE/Ag, sugerindo que a sinalização seja dependente de cálcio. O aumento da expressão de citocinas mediado pela IL-1 foi confirmado por PCR-RT e por Northern Blot. Sugere-se assim um papel para IL-1 na estimulação de múltiplas citocinas derivadas de mastócitos (HULTNER et al., 2000).

*Clostridium difficile* é um agente etiológico que causa diarréia e colites. Antibióticos e drogas citotóxicas causam um distúrbio na flora causando um crescimento de *C. difficile* e produção de toxinas A e B. A toxina A elucida uma resposta inflamatória aguda, congestão e necrose quando inoculada no intestino. Isto é quimiotactismo e induz a liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos e neutrófilos. Alguns estudos sugerem que mastócitos executam um importante papel na patofisiologia da toxina A. Pois, a administração da toxina A dentro das alças do íleo de ratos promove a liberação de mediadores inflamatórios como leucotrieno B4, fator de ativação de plaquetas e protease II dos seus mastócitos de mucosa. Tem sido proposto que a toxina A induz a secreção de mediadores inflamatórios de mastócitos diretamente ou indiretamente através da liberação da substância P, ativador de mastócitos (CALDERÓN et al., 1998). Ao contrário de macrófagos, os mastócitos armazenam TNF- $\alpha$  em grânulos e podem liberá-los após ativação da toxina A e participar da fase recente da reação da inflamação. TNF- $\alpha$  também é conhecido como causador de necrose de células epiteliais do intestino. Assim TNF- $\alpha$  derivado de mastócitos podem executar um papel nos danos da mucosa e acumulação de fluidos observados em colites associadas a *C. difficile* (CALDERÓN et al., 1998).

Mastócitos da submucosa do jejunum e do baço de camundongos infectados por *Trichinella spiralis* expressam protease serina 9 (mMCP-9) durante a fase de recuperação. Esta protease é primeiramente expressa nos mastócitos da submucosa do jejunum, antes de ser detectada em qualquer outra célula, inclusive células esplênicas. O fato da mMCP-9 ser detectadas nos vasos sanguíneos esplênicos e do

número de mastócitos diminuir no jejuno suporta a idéia de que muitos mastócitos se translocam do jejuno para o baço durante a fase de recuperação. Isto demonstra que existe uma via de tráfego de eosinófilos dependentes de células T e mastócitos após sua expansão no jejuno durante infecções hemínticas. (FRIEND et al., 2000).

### 3.2- *Toxoplasma gondii*

#### 3.2.1- Histórico e Taxonomia

*Toxoplasma gondii* é um protozoário e parasita, obrigatoriamente, intracelular descrito em dois importantes laboratórios: Instituto Biológico de São Paulo (SPLENDORE, 1908) em coelhos e Instituto Pasteur De Tunis (NICOLLE & MANCEUX, 1908) em um roedor do norte da África, o *Ctenodactylus gondi*, o qual deu origem ao nome da espécie (PFEFFERKON, 1990). O nome do gênero é derivado da palavra grega “toxon” (arco) em referência ao formato do organismo.

O parasita pertence ao reino Protista, subreino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina e família Sarcocystidae (WERK, 1989).

#### 3.2.2- Morfologia

O protozoário possui forma oval ou arqueada mede, aproximadamente, 6 $\mu$ m de comprimento e 2 $\mu$ m de largura e caracteriza-se por apresentar duas regiões distintas: uma extremidade anterior afilada onde situa-se o aparelho apical e outra no polo oposto arredondada. Possui um núcleo, organelas citoplasmáticas típicas de células eucariontes e duas membranas: uma externa contínua, a membrana

plasmática, propriamente dita, e outra interna composta por duas membranas que formam um complexo, que é descontínuo e interrompido por fenestrações.

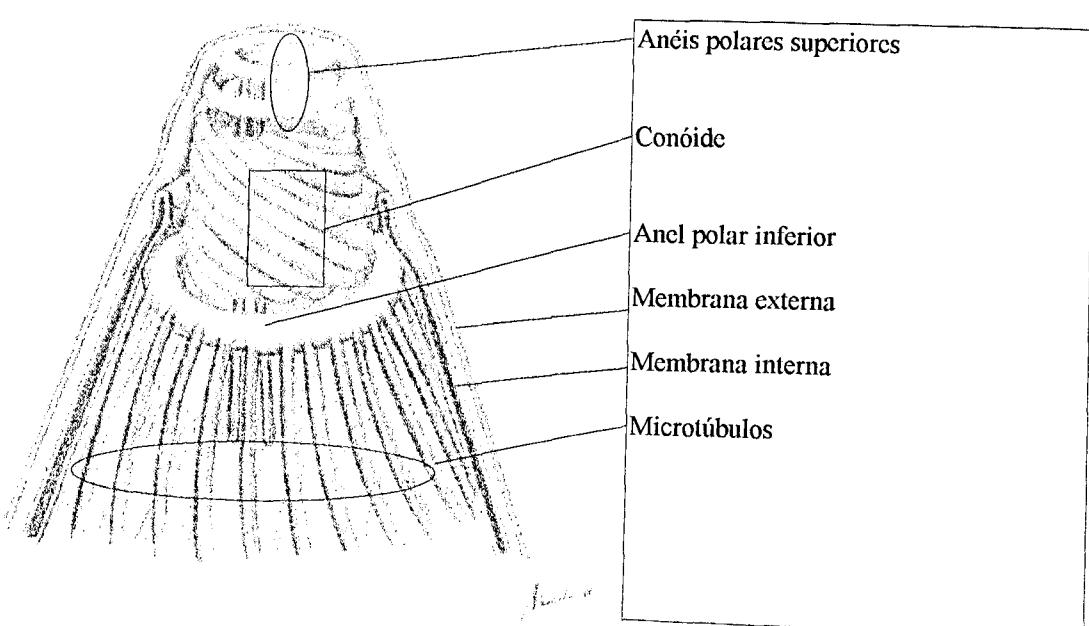
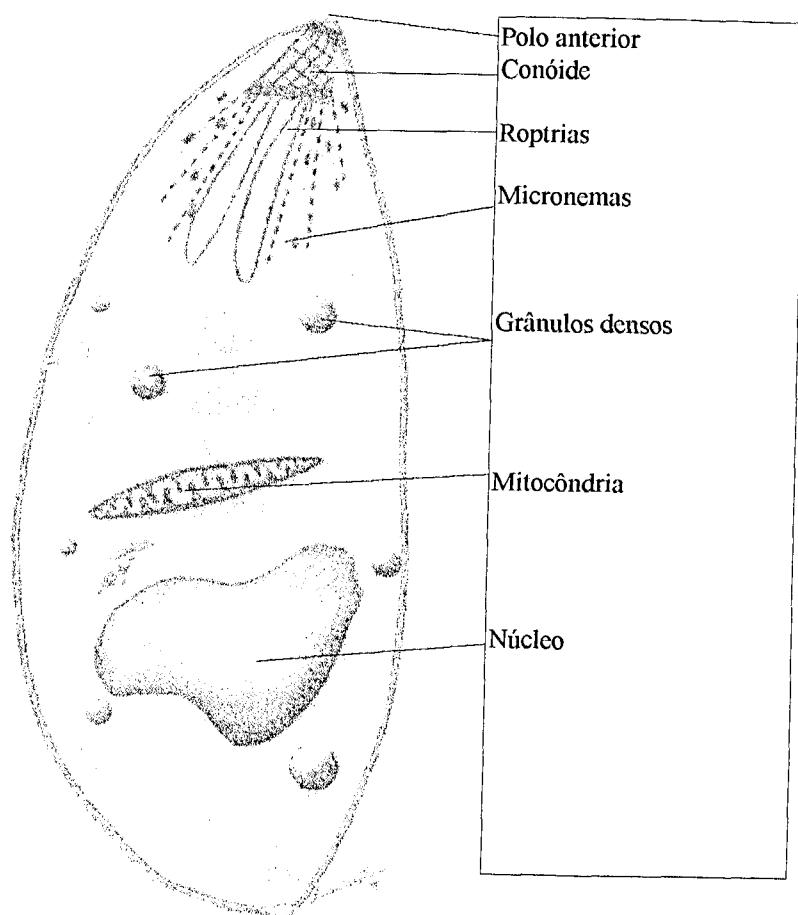
O aparelho apical é formado por uma prega que delimita uma depressão central. Logo abaixo desta depressão situa-se o conóide, uma organela em forma de cone oco formada por um sistema de três anéis ligados por microtúbulos que se cruzam obliquamente. Do anel inferior partem 22 microtúbulos que se dispõem de maneira espiral sob a membrana interna e dirigem-se para a metade posterior do corpo do *T. gondii* onde terminam-se livremente.

No interior do conóide situam-se as roptrias e os micronemas que são formações membranosas. As roptrias são em número de oito a dez, possuem forma de clava e função secretória durante a penetração do parasita, já os micronemas são estruturas filiformes e não possuem função exata conhecida, mas acredita-se que têm um importante papel na penetração do parasita.

No citoplasma do protozoário existem estruturas envoltas por membranas de conteúdo elétron-denso, chamadas grânulos densos, que contém uma família de glicoproteínas com diferentes pesos moleculares. Os grânulos densos possuem抗ígenos em seu conteúdo que foram classificados em sete grupos: de GRA1 a GRA7, segundo as características das glicoproteínas que compõem tais抗ígenos. Após a invasão da célula hospedeira, os protozoários exocitam o conteúdo dos seus grânulos densos no interior do vacúolo parasitóforo (LERICHE & DUBREMETS, 1990).

Os esquemas, a seguir, mostram a estrutura do protozoário.

## Esquemas do protozoário segundo Nichols &amp; Chiappino, 1987



### 3.2.3- Citoesqueleto

O sucesso do parasitismo deste protozoário se deve a rapidez em invadir as células, utilizando receptores altamente conservados entre espécies filogeneticamente distantes (WERK, 1989; BUCKLEY, 1973), tornando praticamente todos os animais susceptíveis a se comportarem como hospedeiros intermediários e disseminadores do parasita.

Este processo de invasão envolve várias moléculas, como ocorre em outros protozoários, e pode-se distinguir cinco fases: (1) reconhecimento célula-célula; (2) adesão entre as células; (3) entrada no interior das células hospedeiras; (4) secreção de抗ígenos pelo protozoário e (5) modificações na membrana do vacúolo parasitóforo. Na membrana externa do *T. gondii* predomina uma glicoproteína de PM de 30 kDa, a qual tem um importante papel na invasão das células hospedeiras uma vez que quando esta glicoproteína é bloqueada o processo de invasão não ocorre (MINEO & KASPER, 1994). Além desta glicoproteína outras moléculas presentes na matriz extracelular do hospedeiro são necessárias ao processo de invasão tais como laminina e fibronectina (WERK, 1989; FURTADO et al., 1992).

Na membrana do *T. gondii* existe um receptor para fibronectina (WERK, 1989), assim como existem receptores para fibronectina nas células hospedeiras. Dessa maneira a fibronectina atua como ligante entre a célula hospedeira e o parasita, permitindo a aproximação entre o *T. gondii* e a célula hospedeira. De maneira semelhante ao que ocorre com a fibronectina, a laminina desempenha papel importante no processo de adesão *T. gondii*/célula hospedeira. Na membrana plasmática do *T. gondii* existem receptores para laminina da mesma forma que existem receptores para laminina na membrana plasmática da célula hospedeira (integrinas). Assim, a laminina permite a aproximação parasita/célula hospedeira (JOINER et al., 1989; FURTADO et al., 1992).

Embora o parasitismo intracelular seja um evento essencial ao ciclo de vida do *T. gondii*, ainda não é completamente conhecido o mecanismo de invasão das células hospedeiras. Algumas evidências sugerem que a invasão seja um processo ativo, dependente do metabolismo energético e da capacidade motora do parasita

(BONHOMME et al., 1992). Esta habilidade motora envolve movimentos espiralares do corpo celular dependentes do citoesqueleto localizado, principalmente, no conóide. Após o contato físico com a célula hospedeira os microtúbulos que rodeiam o conóide se rearranjam e expandem o conóide em direção a membrana da célula hospedeira.

Apesar da sugestiva participação dos microtúbulos na atividade motora do parasita, drogas capazes de interferir com a dinâmica dos microtúbulos, como o nocodazol e a colchicina, foram incapazes de bloquear a invasão do parasita em células hospedeiras (NICHOLS & CHIAPINO, 1987).

Existe a possibilidade de que outras proteínas do citoesqueleto, tais como a actina e a miosina, possam estar envolvidas no processo de invasão. De fato, há evidências experimentais de que as citocalasinas, drogas capazes de interferir com a polimerização dos filamentos de actina, inibam a motilidade do parasita e o processo de invasão (RUSSEL, 1981).

### 3.2.4- Formas evolutivas e Ciclo biológico

*Toxoplasma gondii* é um dos parasitas protozoários mais abundantes da natureza: aproximadamente 25% da população global humana está, cronicamente, infectada (DUBEY, 1997), é cosmopolita e se desenvolve nos mais diversos tipos celulares de mamíferos e até mesmo em alguns tipos de invertebrados (WERK, 1989).

O *T. gondii* possui três formas evolutivas: os taquizoítas, os bradizoítas e os esporozoítas, estes últimos são encontrados apenas em oocistos. Tais estágios estão, intimamente, ligados a um complexo ciclo de vida. O ciclo biológico completo do parasita desenvolve-se em duas fases, uma assexuada que ocorre tanto nos hospedeiros intermediários como nos definitivos (nestes encontram-se as formas taquizoíta e bradizoíta) e uma fase sexuada que ocorre apenas nos hospedeiros definitivos: os felídeos domésticos e selvagens (que possuem oocistos contendo os esporozoítas).

O fase sexuada do ciclo de vida do parasita inicia-se com a ingestão de cistos teciduais (contendo bradizoítas) pelo gato ou outro felídeo culminando, após várias etapas intermediárias, na produção de macro e microgametas no intestino do felídeo. A fusão dos gametas produz um zigoto, que secreta uma membrana cística rígida, e este é eliminado com as fezes como oocisto não esporulado. Durante a infecção aguda um gato pode excretar por volta de 100 milhões de parasitas por dia (KASPER & BOOTHROYD, 1993). Após 1 a 5 dias de exposição ao ar e à temperatura ambiente, o oocisto esporula e produz dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (DUBEY, 1997). Então, tais oocistos tornam-se altamente infecciosos e podem permanecer viáveis por muitos anos no solo ou serem accidentalmente ingeridos por humanos e outros animais. A fase assexuada ocorre em aves e mamíferos e o parasita se divide por endodiogenia, um processo semelhante a divisão binária (KASPER & BOOTHROYD, 1993), no qual duas células filhas formam-se no interior da célula mãe.

Quando ingeridos por hospedeiros não felinos os esporozoítas liberados infectam o epitélio intestinal do hospedeiro intermediário e produzem as formas assexuadas de taquizoítas, ocorrendo assim uma infecção aguda e talvez, posteriormente, uma infecção crônica com o desenvolvimento das formas taquizoítas em bradizoítas. Os taquizoítas (*Takys* = rápido em grego) penetram nas células e começam a se multiplicar rapidamente por endodiogenia, são encontrados no interior de células nucleadas formando pseudocistos. 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 pelo sistema nervoso central e músculos (KASPER & BOOTHROYD, 1993). Os bradizoítas (*Bradys* = lento em grego) são organismos que se multiplicam, lentamente, no interior de cistos teciduais intracelulares e aí permanecem sem

prejudicar o hospedeiro, caso seu sistema imune seja competente; porém, uma deficiência na sua imunidade poderia desencadear a proliferação do protozoário.

O parasita penetra na célula hospedeira e produz a membrana do vacúolo parasitóforo com a participação da membrana plasmática da célula hospedeira (KIMATA & TANABE, 1987; PFEFFERKORN, 1990). A membrana especializada do vacúolo parasitóforo, uma bicamada fosfolipídica, não apresenta marcadores da membrana plasmática da célula hospedeira, tornando-o incompetente para se fundir a outros compartimentos celulares, como lisossomos (JOINER & DUBREMETZ, 1993). A proteína de superfície P30 está presente na rede de membrana e na membrana do vacúolo parasitóforo logo após a invasão do *T. gondii*, sugerindo que produtos do parasita migrem da superfície do parasita para a membrana do vacúolo, tornando-a uma membrana híbrida (KIMATA & TANABE, 1987).

### 3.2.5- Vias de infecção

*Toxoplasma gondii* é transmitido pela ingestão de alimentos contaminados (carne, leite ou vegetais); pela transmissão transplacentária; pela transmissão dérmica, através de lesões; pela transfusão sanguínea ou por algum acidente laboratorial. 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 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, pois a maioria das vezes é assintomática, entretanto a infecção congênita do feto ou a infecção de pessoas imunocomprometidas (pacientes com câncer, transplantados e pacientes com AIDS) pode resultar em lesões debilitantes e até mesmo levar à morte.

Em pacientes imunodeprimidos, a toxoplasmose é uma infecção oportunista, acometendo especialmente o sistema nervoso central e desenvolvendo um quadro de encefalite aguda que pode matar em poucos dias. A encefalite toxoplásrica quase sempre ocorre devido a reativação de uma infecção crônica resultante de falha do sistema imunológico (WONG & REMINGTON, 1993). A natureza recidivante desta encefalite, em organismos imunodeprimidos, torna seu tratamento permanentemente necessário. Pacientes imunodeprimidos acabam sendo prejudicados, pois o tratamento prescrito como clássico para toxoplasmose, sulfadiazina associada à pirimetamina, deprime a medula óssea, prejudicando a produção de células de defesa, deixando mais vulnerável um organismo já debilitado. Sulfadiazina e clindamicina são os antibióticos de escolha para o tratamento da toxoplasmose, mas há necessidade de doses próximas a doses tóxicas, para que o tratamento seja efetivo (ETTINGER, 1992).

Em indivíduos imunocompetentes a toxoplasmose não é fatal, mas o grande problema encontrado nestes são as fêmeas prenhes devido a infecção transplacentária que pode levar ao abortamento espontâneo ou a deficiência do feto em hospedeiros intermediários. Freqüentemente, as crianças nascidas com toxoplasmose congênita apresentam alterações, as mais comuns são: coriorretinite, microencefalia, distúrbio do comportamento e calcificações cerebrais.

A pesquisa sobre vacinas é um dos principais desafios hoje no controle da toxoplasmose, particularmente em países subdesenvolvidos, onde a miséria e a falta de higiene são, conseqüentemente, muito elevadas. Nestes locais a vacinação em massa é a melhor forma de prevenção de doenças. A vacinação de felídeos é um importante passo para prevenção da doença pois, se um método eficiente de imunização for utilizado neste hospedeiro, é possível se estabelecer a interrupção do ciclo biológico do parasita pela via de contaminação por oocistos.

Grande parte das informações sobre a resposta imune e as informações histológicas sobre a presença do parasita nos tecidos do hospedeiro murino está ainda intensamente baseada em modelos de animais infectados, com cistos ou taquizoítas, pela via intraperitoneal (MCLEOD et al., 1984).

### 3.2.6- Cepas de *Toxoplasma gondii*

Diferentes cepas têm sido isoladas e são, geralmente, classificadas como virulentas ou avirulentas com base na sua patogenicidade e/ou antigenicidade para o modelo experimental camundongo, o qual será resistente ou suscetível (BOHNE et al., 1993c).

HOWE & SIBLEY (1995) analisaram 106 amostras do parasita com diferentes graus de virulência e determinaram a estrutura genética populacional do *T. gondii*. Estes autores demonstraram 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 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 toxoplásrica (HOWE & SIBLEY, 1994). O principal critério para avaliar a virulência de uma cepa é a porcentagem de mortalidade de camundongos e o tempo que esses animais levam para sucumbir (FERGUSON & HUTCHISON, 1981). 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. Uma dose de 105 taquizoítas desta cepa seria suficiente para matar em 6-7 dias camundongos BALB/c; a mesma dose em ratos F344/N não produz mortalidade (FUJII et al., 1983). Ratos Fischer fêmeas também se mostraram resistentes a infecção com  $8 \times 10^6$  taquizoítas (ZENNER et al., 1993).

A cepa ME49 foi originalmente isolada da musculatura de carneiro. Ela é cistogênica e considerada avirulenta ou de baixa virulência (LUNDE & JACOBS, 1983). Em camundongos BALB/c a cepa ME49 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., 1993a).

A cepa PJA é uma cepa cistogênica que é mantida na Universidade Estadual de São Paulo, no campus de Jaboticabal, em camundongos tratados com sulfadiazina. Não há registros na literatura de dados relativos ao estudo da cinética da infecção por esta cepa em camundongos BALB/c.

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).

### 3.2.7- Resposta imune ao protozoário

Os antígenos somáticos e os secretados e excretados (ESA) por *T. gondii*, geram respostas imunitárias específicas. São reconhecidos, por soro humano proveniente de pacientes infectados, durante a fase crônica da infecção pelas respectivas massas moleculares: 108, 97, 86, 69, 60, 57, 42, 39, 28, 5, 27 e 26 kDa. Imunização de ratos Fischer com tais ESA leva à hipergamaglobulinemia e a transferência do soro desses ratos para camundongos nu/nu induz significante proteção contra a cepa RH (DARCY et al., 1988).

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 (KITTAS & HENRY, 1980). Em camundongos SCID, os machos são mais resistentes do que as fêmeas e essa resistência está

associada com uma maior produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , produzidos respectivamente por macrófagos e células "natural killer" (NK) (WALKER et al., 1997).

A linhagem do 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 Ld no cromossomo 17 (por exemplo, camundongos BALB/c) têm menores quantidades de cistos cerebrais e menor desenvolvimento de encefalite em relação àqueles que não apresentam tal gene (por exemplo, camundongos C57BL/10J).

Sabe-se que o principal mecanismo de eliminação de parasitas intracelulares, particularmente *T. gondii*, é uma apresentação de resposta imune do tipo Th1 pelo hospedeiro que leva a produção das citocinas IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (GAZZINELLI et al., 1991 e HUNTER et al., 1995).

Os macrófagos são fundamentais na eliminação do parasita. A secreção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-12, o estímulo de células NK que leva a produção de INF- $\gamma$  por células T e a secreção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase são alguns dos mecanismos de combate do hospedeiro, fundamentais na eliminação do parasita (KERSTEN 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 neural e do tecido muscular. Para facilitar 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 em se detectar parasitas no sangue, exceto por técnicas sensíveis como o 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).

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- $\gamma$  (HUNTER et al., 1994). Estudando-se a resposta imune de camundongos BALB/c (imunocompetentes), HUNTER et al. (1995a) verificaram que a administração de IL-12 em camundongos infectados, pela via intraperitoneal., com a cepa C56 (virulenta) de *T. gondii*, aumentou seu período de sobrevivência e que este efeito foi abolido pela administração de anticorpos anti-IFN- $\gamma$  ou anti-TNF- $\alpha$  e pela depleção de células NK.

IFN- $\gamma$  tem papel crucial na resistência tanto da toxoplasmose aguda quanto crônica, e pode ser produzida por células CD8+, CD4+ e NK, em resposta a IL-12, tanto "in vivo" quanto *in vitro* (SHER et al., 1993; GAZZINELLI et al., 1994b). Presume-se que o IFN- $\gamma$  medeie a morte celular do *T. gondii* através da produção de óxido nítrico ou ainda pela depleção de nutrientes importantes como o triptofano (PFEFFERKORN et al., 1986). SHER et al. (1993) demonstraram que *T. gondii* foi capaz de aumentar a síntese de IFN- $\gamma$  por células NK e células acessórias, independentemente de linfócitos T. Estudos desenvolvidos com *Listeria* demonstraram que  $5 \times 10^4$  células/ poço ( $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) induzem a produção de IFN- $\gamma$  por células NK independente de linfócitos T (BANCROFT et al., 1989; WHERRY et al., 1991; BANCROFT et al., 1991). Estudos similares com *T. gondii* revelam que quantidades inferiores a 10 parasitas por poço, ou 25ng de extrato bruto, ou ainda sobrenadante de cultura diluído 1:100, são suficientes para aumentar a produção de IFN- $\gamma$  (SHER et al., 1993). A diferença entre esses dois patógenos é que, ao contrário de *Listeria*, *T. gondii* não aumenta eficientemente a produção de TNF- $\alpha$  e utiliza moléculas indutoras de IFN- $\gamma$  que são termolábeis e solúveis e não correspondem a constituintes de sua membrana, levando a crer que se trata de um antígeno secretado ou excretado (SHER et al., 1993). Esse mecanismo de produção de IFN- $\gamma$ , independente de linfócitos T, pode atuar como barreira contra a infecção por outros patógenos, aumentando a imunidade natural.

Experimentos utilizando camundongos C57BL/6 infectados com a cepa cistogênica ME49 demonstraram que TNF- $\alpha$  é importante na prevenção da encefalite causada por *T. gondii*, sendo que a depleção de TNF- $\alpha$  induz alto nível de mortalidade na fase aguda, mesmo em camundongos infectados com cepa

avirulenta. O tratamento com anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IFN- $\gamma$  leva a redução de óxido nítrico no cérebro e à exacerbação da encefalite. Ao contrário da malária cerebral onde a depleção destas duas citocinas previne a patologia, na toxoplasmose cerebral a expressão de TNF- $\alpha$  parece refletir no controle imunológico (GAZZINELLI et al., 1993b; GRAU et al., 1992).

Macrófagos infectados por *T. gondii* aumentam a síntese de IL-12 *in vivo* aumentando proporcionalmente os níveis de mRNA para IFN- $\gamma$ , correlacionando-se com o aumento da expressão de抗ígenos de classe II do MHC. A neutralização de IFN- $\gamma$  ou de IL-12 inibe o aumento de抗ígenos de classe II do MHC, resultando na diminuição da resposta celular e aumento da infecção e crescimento do parasita em macrófagos peritoneais de camundongos *in vivo* (GAZZINELLI et al., 1994b).

O papel da IL-12 tem sido estudado também em modelos murinos comparativos de imunocompetência e imunosupressão. Observou-se que a administração dessa citocina, tanto a grupos de camundongos imunocompetentes como a grupos imunosuprimidos (SCID mice) infectados por *T. gondii*, aumenta a sobrevida de maneira significante. Entretanto tal proteção é anulada quando os camundongos são depletados de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou células NK. A depleção de IL-12 resulta em 100% de mortalidade dos camundongos infectados (GAZZINELLI et al., 1994b; HUNTER et al., 1995a) inclusive com a cepa cistogênica ME49 (HUNTER et al., 1995a). Certamente o parasita induz a produção de IL-12 como mecanismo de proteção do hospedeiro, garantindo desta forma o seu habitat e sobrevivência.

### 3.3- Interação mastócito/*Toxoplasma gondii*

HENDERSON & CHI (1998) foram os únicos, até o momento, a estudarem a interação entre mastócitos e *T. gondii*. Utilizaram mastócitos de ratos Sprague-Dawley e o parasita *T. gondii* da cepa RH isolado de camundongos BALB/c, e observaram alterações marcantes. Após a interação *in vitro* os taquizoítas apresentaram-se aderidos às microvilosidades dos mastócitos. Já os mastócitos apresentaram canais intracitoplasmáticos secretórios, grânulos com conteúdo

exibindo elétron-densidade moderada e conteúdo de grânulos no meio extracelular. *T. gondii* mostrou alterações morfológicas induzidas pela presença do mastócito como rompimento de membrana, formação de vacúolos intracelulares e destruição de organelas. Estudaram, ainda, a influência da histamina na interação mastócito/*Toxoplasma gondii*, e confirmaram que a histamina não provoca alterações na ultra-estrutura do *T. gondii*. Isto sugere que o possível mecanismo, estimulador do mastócito, tenha sido a liberação de lisofosfolipídeos das organelas apicais ou das roptrias do parasita. O leucotrieno B4 (LTB4) também revelou-se como importante mediador citotóxico nos processos de inflamação, induzindo a citotoxicidade do *T. gondii* pelo rompimento da membrana e diminuição do conteúdo citoplasmático desses organismos (HENDERSON & CHI, 1998).

Leucotrieno B4 (LTB4) é um componente estimulador das funções eosinofílicas que tem sido identificado nas reações de hipersensibilidade, nas quais a infiltração eosinofílica parece ter um importante papel. Isto sugere uma possível contribuição da LTB4 na atração e ativação dessas células. Estudos *in vivo* demonstram que a migração induzida pelo LTB4 foi abolida pela depleção de células peritoneais, então o efeito do LTB4 parece ser indireto, mediado por outras substâncias e sua liberação pode ser inibida por glicocorticoides (como dexametasona que é conhecido como bloqueador do ácido araquidônico). Este mecanismo indireto se dá possivelmente através da liberação de outros mediadores quimiotáticos eosinofílicos pelas células peritoneais (OLIVEIRA et al., 1994).

## *Material e Métodos*

## 4- Material e Métodos

### 4.1- Animais

Foram utilizados *Calomys callosus* (linhagem Canabrava) machos adultos, com, no mínimo, 12 semanas, pesando em média 34 gramas, oriundos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e mantidos no biotério do Setor de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia com dieta de água e ração *ad libitum* para ratos e camundongos Nuvilab CR1 (Nuvital), complementada com semente de girassol e aveia com casca.

### 4.2- Manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii* e sua inoculação nos animais para os experimentos *in vivo*

*Toxoplasma gondii*, da cepa RH, foram mantidos por inoculações intraperitoneais em camundongos Swiss, seguindo-se um critério de 48 a 72 horas de intervalo, no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Os exudatos peritoneais foram colhidos através da lavagem com 4ml de PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2) estéril, esta solução que foi injetada na cavidade peritoneal e retirada. O exudato colhido foi analisado à microscopia de luz para verificação de possíveis contaminações por bactérias, hemácias ou outros tipos celulares presentes neste microambiente. Os exudatos com menor grau de contaminação e maior quantidade de parasitas foram selecionados para repique e utilizados nos experimentos.

Para os estudos *in vivo*, animais adultos foram inoculados, intraperitonealmente, com um único inóculo de  $10^5$  taquizoítas de *T. gondii* imersos em 400 $\mu$ l de PBS. Os animais controles receberam a mesma quantidade de PBS.

Todos os animais de experimentação utilizados foram anestesiados com éter (éter etílico P.A.) e sacrificados com deslocamento cervical. O controle da infecção dos animais inoculados por *T. gondii* foi feito através da análise do exudato peritoneal, os animais não infectados foram desprezados.

#### 4.3- Experimentos *in vivo*

##### 4.3.1- Comportamento dos mastócitos após 48 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*

Para a análise morfológica dos mastócitos encontrados no fígado, orelha, íleo, linfonodos submandibular e dorsal foram utilizados seis animais infectados e dois animais controles. Os animais foram sacrificados após 48 horas de infecção, mantendo-se jejum prévio de 12 horas. A coleta dos órgãos, foi feita sempre pela manhã, uma vez que o mastócito possui ciclo circadiano (POLAT, 1980). Fragmentos de fígado, orelha, íleo, linfonodos submandibular e dorsal foram colhidos com auxílio de um estereomicroscópio. Para a identificação dos linfonodos utilizou-se a descrição feita por AZZALI & DIDIO (1965). Após a colheita os fragmentos foram processados seguindo-se os procedimentos de rotina, descritos a seguir, para análise à microscopia eletrônica de transmissão.

###### 4.3.1.1- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos de fígado, orelha, íleo, linfonodos submandibular e dorsal colhidos foram fixados por imersão em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2%) em tampão cacodilato de sódio 0,1M (cacodylic acid sodium salt trihydrate purum P.A.- Fluka) em pH 7,2.

(KARNOVSKY, 1965) durante 17 horas a 4°C. Foram pós-fixados em tetróxido de ósmio reduzido com ferrocianeto de potássio: (Merck S. A. Inds. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil) tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M com ferrocianeto de potássio a 1,5% por 1 hora à temperatura ambiente. Após a fixação, foram lavados em tampão cacodilato de sódio e desidratados em etanol (álcool etílico absoluto P.A. 99,5%) em concentrações crescentes. Após duas passagens em acetona (acetona P.A. 99,5%) iniciou-se a pré-infiltração, que foi feita lentamente, em três etapas utilizando-se a mistura acetona e resina à base de Epon (Epon 812- Fluka Chemie, Buchs, Switzerland). Durante a primeira e segunda etapas o material foi mantido em mistura de acetona/ resina Epon na proporção de 2:1 e 1:1 (v/v), respectivamente, e em cada concentração ficou imerso por uma noite; na terceira etapa utilizou-se a proporção de 1:2 (v/v), acetona/ resina Epon, por 4 horas a 37°C. No dia seguinte, a solução foi submetida à infiltração com resina plena, por 4 horas a 37°C. Finalmente, foram incluídos devidamente orientados e mantidos em estufa a 60°C por 24 horas, no mínimo, para polimerização da resina e consequente endurecimento.

Os blocos com o material incluído foram aparados e preparados para microtomia na máquina de talhar (Reichert-Jung). Cortes semi-finos de 0,5µm foram corados com azul de toluidina O a 1% (toluidin blau O- Merck, Darmstadt, Germany) e borato de sódio a 1% (borax anhydricum- Reagentes para análise ECIBRA- Curitiba, Brasil) a 80°C durante 30 a 60 segundos. Estes cortes foram analisados para selecionar-se a melhor área para ultra-microtomia.

Para os estudos ultra-estruturais, os cortes ultra-finos foram submetidos à dupla coloração com acetato de uranila a 3% (uranylacetat- Merck), durante 40 minutos a 37°C, método descrito por WATSON (1958), e citrato de chumbo a 1% (lead II- citrate trihydrate purum- Fluka), durante 40 minutos à temperatura ambiente, método descrito por REYNOLDS (1963) e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão EM-109 (Zeiss) do Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 4.3.2- Cinética do comportamento dos mastócitos frente a infecção por *Toxoplasma gondii*

Para a análise comportamental dos mastócitos da cavidade peritoneal foram utilizados vinte e um animais infectados e vinte e um animais controles.

Os exudatos peritoneais dos animais controles e experimentais foram colhidos com solução polieletrolítica para diálise peritoneal (CAPD com 4,5% de glicose, isenta de potássio, Fresenius Laboratórios Ltda.), centrifugados a 500g por 10 minutos a 37°C e ressuspendidos com 1ml da mesma solução. O exudato colhido quando apresentava-se hemorrágico era desprezado.

A suspensão celular foi corada com azul de toluidina O a 0,5% e borato de sódio 1%, na proporção 10/1, e a partir desta mistura corada fez-se a contagem dos mastócitos.

A contagem da quantidade de mastócitos presente no exudato peritoneal foi feita em diferentes intervalos de tempo após a infecção: 1, 3, 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Este mesmo procedimento de contagem foi realizado em exudatos colhidos de animais controles obedecendo-se os mesmos intervalos de tempo, utilizados para o estudo em animais infectados.

Os mastócitos foram contados utilizando-se uma câmara hemocitométrica ou câmara de Newbauer. A câmara hemocitométrica recebeu 10 $\mu$ l da suspensão corada e seus campos diagonais foram analisados com correção 10<sup>4</sup>, a análise foi feita com a objetiva 40x, os mastócitos aí presentes foram contados e registrados com o auxílio de um contador manual.

#### 4.3.3- Comportamento dos mastócitos após 12 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*

Para a análise comportamental dos mastócitos da cavidade peritoneal foram usados oito animais infectados e quatro animais controles.

Colheu-se, após 12 horas de infecção por *T. gondii*, os exudatos peritoneais de *C. callosus* com solução polieletrolítica para diálise peritoneal. Após a colheita, os exudatos foram centrifugados a 500g por 10 minutos a 37°C, lavados com 5ml da mesma solução e centrifugados novamente sob as mesmas condições. O exudato colhido quando apresentava-se hemorrágico era desprezado. Em seguida, as suspensões celulares foram ressuspensas em 10ml de solução fixadora. Utilizou-se como fixador para análise à microscopia de luz o paraformaldeído 4% diluído em solução polieletrolítica para diálise peritoneal, durante 1 hora, e a mesma solução para lavagem do material. Após a lavagem o material foi desidratado em etanol absoluto por 3 vezes e seguiu-se os procedimentos de rotina para inclusão em resina plástica a base de glicol metacrilato (Tecknovit 7.100 - KULZER). Cortes de 2 e 3µm de espessura foram obtidos através de navalha de vidro. Os cortes foram distendidos em água destilada gelada, depositados em lâminas histológicas e mantidos à temperatura ambiente para a secagem. Em seguida, os cortes foram corados por 1 minuto com solução aquosa de azul de toluidina O a 0,5% e borato de sódio 1%, montados com entellan (entellan neu- Merck, Darmstadt, Germany), analisados e fotografados no fotomicroscópio Polyvar (Reichert-Jung) do Laboratório de Histologia.

Para análise à microscopia eletrônica de transmissão utilizou-se a solução fixadora de Karnovsky modificada, durante 1 hora, e o tampão cacodilato de sódio para lavagem do material, após a fixação o material foi processado rotineiramente para análise à microscopia eletrônica de transmissão como descrito no item 4.3.1.1.

#### **4.4- Experimentos *in vitro***

##### **4.4.1- Purificação dos mastócitos**

Utilizou-se nos experimentos *in vitro* exudatos peritoneais de *C. callosus* que foram colhidos com 4ml de solução polieletrolítica para diálise peritoneal,

centrifugados a 500g por 10 minutos a 37°C, lavados com 10ml da mesma solução e centrifugados novamente sob as mesmas condições. O exudato peritoneal quando apresentava-se hemorrágico era desprezado.

Após estes procedimentos, o fluido peritoneal foi purificado com uma solução de Percoll (Sílica coberta com PVP- polivinilpirrolidona- coloidal para separação de células) isotônica (Percoll acrescido de 11% de glicose e 5,5% de solução polieletrolítica para diálise peritoneal) ficando em repouso por 10 minutos, seguiu-se nova centrifugação e as duas camadas superiores que se formaram foram desprezadas (RODRIGUES, 1999). O volume restante no tubo que continha os mastócitos foi lavado com a solução polieletrolítica para diálise peritoneal. Esta metodologia não é 100% eficiente, portanto mesmo após o processo de purificação ainda restam outros poucos tipos celulares.

#### 4.4.2- Interação mastócito/*Toxoplasma gondii*

A interação *in vitro* entre mastócito/*T. gondii* foi estudada após a purificação dos mastócitos do exudato peritoneal de trinta *C. callosus*, e sua quantidade foi determinada pela contagem destes em câmara hemocitométrica. Neste momento, após a purificação e a contagem, uma porção da solução que continha os mastócitos foi fixada e utilizada como controle da reação.

Os taquizoítas utilizados foram obtidos de passagens seriadas *in vivo*, seguindo-se um critério de 48 a 72 horas de intervalo, metodologia descrita no item 4.2. Estas formas foram colhidas após lavagem, com 4ml de PBS estéril, da cavidade peritoneal de camundongos Swiss e centrifugadas a 500g por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas com 10ml de solução polieletrolítica para diálise peritoneal e centrifugadas novamente sob as mesmas condições. Após este procedimento a suspensão foi contada em câmara hemocitométrica e o número de parasitas ajustado para 6x o número de mastócitos, ou seja, na proporção de 1 mastócito/6 parasitas de acordo com HENDERSON & CHI (1998).

Os parasitas foram incubados com os mastócitos e três intervalos de tempo foram investigados: zero, 30 e 60 minutos. Assim que os parasitas foram adicionados aos tubos contendo os mastócitos, processou-se a fixação do material obedecendo-se os intervalos de tempos pré-determinados: zero, 30 e 60 minutos de incubação. Utilizou-se como fixador a solução de Karnovsky, durante 1 hora e o tampão cacodilato de sódio para lavagem do material.

Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000g por 5 minutos a 37°C, ressuspensas em Ágar Noble 3% (Laboratórios Difco Ltda) e processadas seguindo-se a metodologia para microscopia eletrônica de transmissão descrita no item 4.3.1.1.

#### 4.4.3- Imunocitoquímica da interação mastócito/*Toxoplasma gondii*

A interação entre mastócitos e *T. gondii* foi investigada imunocitoquimicamente, utilizando-se duas técnicas durante a preparação celular: cultura de células e suspensão de células. A análise deste material foi realizada através do microscópio confocal LEICA TCS-NT (Projeto FAPESP 95/6199-3, engenheira responsável Márcia Sirlene Zardin Graess do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).

##### 4.4.3.1- Cultura de células e Suspensão celular

Após a purificação, a suspensão do exudato peritoneal de vinte *C. callosus* contendo os mastócitos foi ressuspensa em RPMI completo (meio para cultura de células: RPMI medium 1640 com L-glutamina e bicarbonato de sódio) com gentamicina, suplementado com 5% de soro bovino fetal (Sigma). A quantidade de células foi determinada por contagem em câmara hemocitométrica.

Em seguida, os mastócitos foram adicionados sobre lamínulas redondas, de 13mm de diâmetro acondicionadas em placas de cultura por 48 horas, para aderência a estas lamínulas, em estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 horas os poços das placas de cultura, que continham as lamínulas redondas, foram aspirados e lavados duas vezes com meio RPMI completo, para descarte das células não aderidas.

Os taquizoítas utilizados foram obtidos de passagens seriadas *in vivo*, seguindo-se um critério de 48 a 72 horas de intervalo, metodologia descrita no item 4.2. Estas formas foram colhidas após lavagem, com 4ml de PBS estéril, da cavidade peritoneal de camundongos Swiss e centrifugadas a 500g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento resultante após centrifugação foi ressuspendido em RPMI completo, e submetido a outro ciclo de centrifugação sob as mesmas condições. A viabilidade dos taquizoítas foi determinada pela contagem diferencial com o corante vital azul de tripan (Trypan blue solution-0,4%- Sigma). Após ajustar-se a concentração para 6 taquizoítas/1 mastócito, esta suspensão foi distribuída nos poços das placas de cultura que continham as lamínulas redondas.

Os parasitas foram incubados com os mastócitos e três intervalos de tempo foram investigados: zero, 30 e 60 minutos. Como controle da reação algumas lamínulas não foram incubadas com os parasitas, permanecendo apenas os mastócitos nestas. Assim que os parasitas foram adicionados às lamínulas, que continham os mastócitos, processou-se a fixação do material obedecendo-se os intervalos de tempo pré-determinados: zero, 30 e 60 minutos de incubação. Utilizou-se como fixador o paraformaldeído 4% diluído em solução polieletrolítica para diálise peritoneal, durante 1 hora. As lamínulas passaram por duas lavagens, de 10 minutos cada, com solução polieletrolítica para diálise peritoneal, seguindo-se a permeabilização celular com 0,5% de Triton X-100 (t-Octilfenoxipolietoxietanol, Sigma Chemical Co. Saint Louis, MO, USA) durante 10 minutos e um outro ciclo de lavagens (duas lavagens) com duração de 10 minutos cada utilizando-se a mesma solução.

Em seguida, as lamínulas foram bloqueadas com soroalbumina bovina 1% (BSA- Sigma) diluída em solução polieletrolítica para diálise peritoneal, durante 1

hora à temperatura ambiente e lavadas duas vezes com a mesma solução, por 10 minutos cada lavagem. As lamínulas foram incubadas, para cada intervalo de tempo (zero, 30 e 60 minutos) com anticorpo monoclonal primário E9 anti-*T. gondii* produzido em camundongo (fabricado pelo próprio Laboratório de Imunologia da UFU), não diluído, por 1 hora à temperatura ambiente e/ou com soros de camundongos, diluídos 1/100, reagentes e não-reagentes para *T. gondii*, durante 1 hora à temperatura ambiente. Este anticorpo monoclonal liga-se especificamente à proteína P-30 ou SAG-1 que é uma proteína de superfície presente na membrana plasmática do *T. gondii*. As lamínulas passaram por mais duas lavagens de 10 minutos cada e foram incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo, específico para cadeia  $\gamma$ , conjugado a fluoresceína- FITC- desenvolvido em cabra (Sigma), diluído 1/50, por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas duas vezes com tampão carbonato (carbonato de sódio anidro 0,5M e bicarbonato de sódio 0,5M), por 10 minutos cada lavagem.

Após a lavagem, as lamínulas foram coradas com azul de Evans 1%, durante 1 minuto, lavadas duas vezes com tampão carbonato, por 10 minuto, montadas em lâminas histológicas com tampão N-propil-galato com glicerol e cobertas por lamínulas de 18mm<sup>2</sup>. Em seguida, foram vedadas e analisadas no microscópio confocal LEICA TCS-NT (Projeto FAPESP 95/6199-3).

A análise do material *in vitro* após cultura de células sugere que os mastócitos de *C. callosus* são células pouco aderentes, sendo assim, no presente trabalho, utilizou-se também a suspensão celular para preparação do material.

Os procedimentos utilizados nos experimentos com suspensão celular foram os mesmos utilizados nos experimentos de cultura de células desde a colheita, purificação, interação mastócito/*T. gondii* até os métodos imunocitoquímicos. Porém, nos experimentos com suspensão celular aboliu-se a etapa de cultura dos mastócitos e a manipulação do material foi feita em tubos contendo as suspensões celulares. Vinte animais foram utilizados nos experimentos desenvolvidos em suspensão celular.

# *Resultados*

## 5- Resultados

### 5.1- Experimentos *in vivo*

#### 5.1.1- Comportamento dos mastócitos após 48 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*

Será descrito, a seguir, as características morfológicas dos mastócitos em diferentes órgãos, bem como possíveis alterações estruturais destes.

##### 5.1.1.1- Orelha

Nos animais controles, os mastócitos do tecido conjuntivo da derme da orelha apresentaram grânulos exibindo, em sua maioria, conteúdo homogêneo e elétron-denso (Fig. 1). Nos animais após 48 horas de infecção por *T. gondii* os mastócitos da derme mostraram grânulos, em sua maioria, com conteúdo exibindo elétron-densidade moderada (Fig. 2). Observou-se, também, nestes animais mastócitos com sinais indicativos de desgranulação: fusão de grânulos (Fig. 3); grânulos com conteúdo grumoso e halo elétron-lúcido (Figs. 3 e 4); amplo canal intracitoplasmático (Figs. 2, 3 e 5); rompimento da membrana plasmática e conteúdo de grânulos no meio extracelular (Fig. 6). Taquizoítas não foram encontrados na derme da orelha.

### 5.1.1.2- Fígado

Durante a colheita do material de *C. callosus* após 48 horas de infecção por *T. gondii* notou-se, aparentemente, aumento no tamanho do fígado destes animais.

Na cápsula do fígado, após 48 horas de infecção por *T. gondii*, encontraram-se com freqüência taquizoítas entre fibrilas colágenas (Fig. 7) e mastócitos apresentando alterações no conteúdo de seus grânulos: fusão de grânulos e conteúdo de grânulo extracelular (Figs. 7 e 8). Células rompidas exibindo alterações citoplasmáticas e, possivelmente, contendo resquícios de roptrias de *T. gondii* foram também observadas (Figs. 7 e 8). Os hepatócitos de animais controles apresentaram um ou mais núcleos esféricos com nucléolo evidente, grânulos grosseiros indicativos da presença de glicogênio, estruturas esféricas exibindo elétron-densidade moderada e retículos granular e agranular (Fig. 9). Nos animais submetidos à infecção notou-se, aparentemente, diminuição da quantidade de glicogênio e um aumento na quantidade das estruturas esféricas descritas nos animais controles envolvidas por cisternas de retículo (Fig. 10). Encontraram-se também taquizoítas nos capilares sinusóides (Fig. 10), em vacúolos parasitóforos no interior de vários tipos celulares como leucócitos (Fig. 11) e hepatócitos (Fig. 12).

### 5.1.1.3- Íleo

Nos animais controles as células do epitélio da mucosa apresentaram-se íntegras. Entre elas encontraram-se células exibindo numerosos microvilos, glicocálice bem desenvolvido e numerosas mitocôndrias. Entre as células absorptivas observou-se células caliciformes com o citoplasma apical repleto de grânulos citoplasmáticos com conteúdo elétron-denso (Fig. 13). Nos animais, após 48 horas de infecção por *T. gondii*, as células absorptivas e caliciformes apresentaram alterações bem evidentes, sugerindo diferentes estágios de degeneração destas células (Figs. 14 e 15). O citoplasma das células absorptivas mostrou-se vacuolizado com suas mitocôndrias, aparentemente, fundidas e desprovidas de cristas,

provavelmente, pelo rompimento destas (Figs. 14 e 15). Nas células caliciformes, observou-se diminuição da elétron-densidade do conteúdo de seus grânulos e fusão acentuada destes formando canais de desgranulação com exocitose acentuada de seus conteúdos. Ainda, observou-se a presença de células em processo de degeneração na superfície do epitélio da mucosa (Fig. 15). Encontraram-se na luz do íleo taquizoítas livres algumas vezes, aparentemente, em processo de divisão e em vacúolo parasitóforo (Figs. 16 e 17). Taquizoítas em vacúolos parasitóforos foram encontrados na submucosa (Figs. 18 e 19), na serosa do íleo (Figs. 20 e 21) e também neste local entre organelas de células rompidas (Fig. 22). Células com vacúolo parasitóforo no mesentério foram também observadas (Fig. 23). Na submucosa do íleo, também encontraram-se mastócitos rompidos contendo taquizoíta no seu interior e em suas proximidades (Fig. 24).

#### 5.1.1.4- Linfonodo dorsal

Nos animais controles, encontraram-se mastócitos no tecido conjuntivo da cápsula que apresentaram numerosos grânulos citoplasmáticos com nítida membrana exibindo conteúdo homogêneo e elétron-denso (Fig. 25 e encarte). Observou-se, também, mastócitos nos seios linfáticos e no tecido linfóide exibindo tais características (Figs. 26 e 27). Nos animais, após 48 horas de infecção por *T. gondii*, detectou-se a presença de taquizoítas em diferentes regiões desse linfonodo: no tecido conjuntivo da cápsula (Fig. 28) e no interior de células presentes nesta região (Figs. 29 e 30). Os taquizoítas estavam em vacúolos parasitóforos de células presentes no tecido linfóide e nos seios linfáticos (Figs. 31 e 32) ou livres (Fig. 33). Foram encontrados mastócitos próximos a locais onde encontravam-se vacúolos com taquizoítas. Estes mastócitos apresentavam grânulos citoplasmáticos exibindo, em sua maioria, conteúdo elétron-denso e homogêneo porém alguns grânulos mostraram conteúdo grumoso e halo elétron-lúcido além da presença de fusão de grânulos evidenciando, possivelmente, a ocorrência de processo de desgranulação (Fig. 34 e encartes). Encontraram-se mastócitos, aparentemente, em interação com

células, inclusive macrófagos, contendo vacúolo parasitóforo contendo taquizoíta apresentando alguns grânulos com conteúdo grumoso e halo elétron-lúcido bem como fusão entre estes grânulos (Fig. 35 e encarte); mastócitos rompidos apresentando amplos canais intracitoplasmáticos contendo grânulos citoplasmáticos exibindo, em sua maioria, conteúdo grumoso e elétron-densidade moderada e, ainda extrusão de grânulos citoplasmáticos (Fig. 36). Nota-se ainda a presença de um taquizoíta, aparentemente, no interior desse mastócito (Figs. 36 e 37). Mastócitos no tecido linfóide apresentando em sua maioria, grânulos citoplasmáticos vazios e elétron-lúcidos e alguns fundidos formando canais intracitoplasmáticos indicativos de processo de desgranulação foram também observados (Fig. 38). Observou-se *T. gondii*, aparentemente, destruído em interação com mastócitos em processo de desgranulação (Fig. 39). Células totalmente rompidas foram, freqüentemente, encontradas em todas as regiões do linfonodo dorsal.

#### 5.1.1.5- Linfonodo submandibular

No linfonodo submandibular de *C. callosus* controles observou-se que os mastócitos exibiam características ultra-estruturais semelhantes às descritas para os mastócitos encontrados no linfonodo dorsal, independente da localização. Após 48 horas de infecção por *T. gondii*, encontraram-se células no tecido linfóide contendo vacúolos parasitóforos com taquizoítas unidos entre si (Fig. 40 e encarte). Notou-se também mastócitos no tecido linfóide e nos seios linfáticos apresentando grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, com conteúdo grumoso e elétron-densidade moderada. Tais grânulos estavam, freqüentemente, fundidos e formando canais (Figs. 41 e 42).

### 5.1.2- Variação do número de mastócitos frente a infecção por *Toxoplasma gondii*, no período de 48 horas

O número de mastócitos presentes no exudato peritoneal dos animais controles foi analisado nos diferentes intervalos de tempo (1, 3, 6, 12, 24, 36 e 48 horas) variou de 15.000 a 27.000 mastócitos por ml, o que correspondeu em média, 20.500 mastócitos por ml.

Após infecção por *T. gondii* o número de mastócitos presente no exudato peritoneal foi analisado nos mesmos intervalos de tempo. Após 1 hora observou-se, em média, 99.000 mastócitos por ml; nos intervalos de 3 e 6 horas observou-se o mesmo resultado para estes dois momentos, em média, 35.000 mastócitos por ml; após 12 horas de infecção notou-se, em média, 55.000 mastócitos por ml e nos intervalos de 24, 36 e 48 horas de infecção havia, em média, 22.000, 7.300 e 3.700 mastócitos por ml, respectivamente (Gráfico 1).

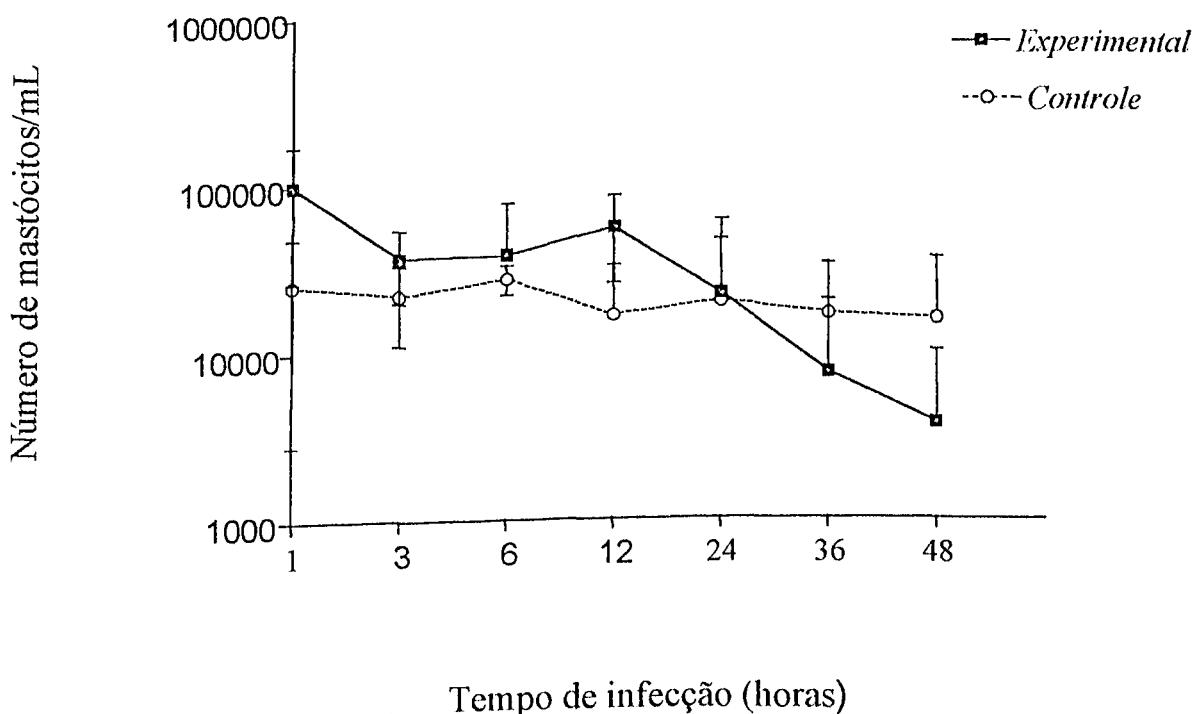


Gráfico 1-Variação do número de mastócitos do exudato peritoneal no período de 48 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*.

### 5.1.3- Comportamento *in vivo* dos mastócitos após 12 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*

#### 5.1.3.1- Microscopia de luz

Os mastócitos do exudato peritoneal de *C. callosus* controles apresentaram, em sua maioria, forma esférica com grânulos citoplasmáticos também esféricos que exibiram diâmetros, aparentemente, uniformes preenchendo quase todo o citoplasma (Fig. 43).

Após 12 horas de infecção, observaram-se no exudato peritoneal, parasitas no interior de diferentes tipos celulares: mastócitos, leucócitos e células semelhantes a macrófagos (Figs. 44 e 45). Encontraram-se mastócitos apresentando grânulos citoplasmáticos de tamanhos variados exibindo forma irregular sugerindo fusão de grânulos (Fig. 46) e outros mastócitos contendo vacúolo parasitóforo com taquizoíta apresentando poucos grânulos citoplasmáticos exibindo halo negativo sugestivo de avançado processo de desgranulação (Fig. 47).

#### 5.1.3.2- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os mastócitos do exudato peritoneal dos animais controles, ultra-estruturalmente, apresentaram-se íntegros e com numerosos grânulos citoplasmáticos exibindo conteúdo, em sua maioria, homogêneo e elétron-denso exibindo diâmetros, aparentemente, uniformes (Fig. 48). Em *C. callosus* após 12 horas de infecção por *T. gondii* mastócitos com vacúolo parasitóforo foram, freqüentemente, observados exibindo sinais indicativos de processo de desgranulação (Fig. 49 e 50). Foram também encontrados mastócitos apresentando grânulos citoplasmáticos com conteúdo elétron-lúcido, às vezes, fundidos formando canais intracitoplasmáticos, semelhantes aos observados na microscopia de luz, ao lado de raros grânulos citoplasmáticos exibindo elétron-densidade moderada (Fig.

51, compare com a Fig. 47). Outros tipos celulares contendo ou não vacúolo parasitóforo apresentaram-se rompidos exibindo núcleo vacuolizado (Fig. 52), inclusive leucócitos. Os taquizoítas foram encontrados geralmente intracelulares, exceto, em um tipo celular que foi observado estar, aparentemente, em processo de invasão (Fig. 53).

No presente trabalho os mastócitos de *C. callosus* da derme da orelha, linfonodos dorsal e submandibular e mastócitos do exudato peritoneal foram morfologicamente semelhantes: apresentando grânulos dispersos no citoplasma que não fazem saliência na membrana plasmática, nem alojam-se em depressões da membrana nuclear e não exibem denteações.

## 5.2- Experimentos *in vitro*

### 5.2.1- Interação mastócitos/*Toxoplasma gondii*

Os experimentos que envolveram cultura de células e suspensão celular revelaram resultados semelhantes, após incubação entre mastócitos e *T. gondii* nos diferentes tempos: zero, 30 e 60 minutos.

À microscopia eletrônica de transmissão, após purificação, os mastócitos do exudato peritoneal de animais controles apresentaram-se íntegros e com numerosos grânulos citoplasmáticos exibindo conteúdo homogêneo, em sua maioria, e com elétron-densidade moderada (Fig. 54). No momento zero de incubação, de mastócitos e *T. gondii*, os mastócitos mostraram-se íntegros e exibindo as características já descritas para estes no material controle (Fig. 54), que continha apenas mastócitos purificados. Os taquizoítas também apresentaram-se íntegros (Fig. 55). Após 30 minutos de incubação, de mastócitos e *T. gondii*, encontraram-se vacúolos parasitóforos em mastócitos que apresentaram diminuição da elétron-densidade do conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos, além de fusão de grânulos

com conteúdo grumoso (Figs. 56, 57 e 58). Observou-se que mastócito em interação com *T. gondii* apresentava aumento na quantidade das suas projeções citoplasmáticas na face de contato com o parasita (Figs. 59 e 60). Notou-se ainda taquizoítas livres e em vacúolos parasitóforos em algumas células, inclusive eosinófilos (Fig. 61). Alguns taquizoítas livres apresentaram diminuição da elétron-densidade dos componentes citoplasmáticos, presença de grandes vacúolos citoplasmáticos indicativos de alteração na morfologia destes parasitas (Fig. 62). Após 60 minutos de incubação, de mastócitos e *T. gondii*, observou-se a presença de vacúolos parasitóforos em mastócitos e em outros tipos celulares (Fig. 63). Os mastócitos, em geral, apresentaram região de Golgi bem evidente com a presença de pró-grânulos; fusão de grânulos citoplasmáticos; grânulos exibindo conteúdo de elétron-densidade variada; grânulos com conteúdo grumoso e, às vezes, com extrusão do conteúdo de seus grânulos (Figs. 63, 64 e 65).

#### 5.2.2- Imunocitoquímica de mastócitos e *Toxoplasma gondii*

A análise ao microscópio confocal demonstrou que nos momentos zero, 30 e 60 minutos após tratamento com soro não imune de camundongo para *T. gondii* os mastócitos e os taquizoítas não exibiram fluorescência e foram corados apenas em vermelho pelo azul de Evans. No material tratado com anticorpo policlonal de camundongo os taquizoítas mostraram-se fluorescentes (Fig. 66). Os núcleos dos taquizoítas e os mastócitos apresentaram-se corados em vermelho pelo azul de Evans. Após incubação do material com o anticorpo monoclonal E9 os taquizoítas apresentaram-se com o limite celular fluorescente (Fig. 67) e os mastócitos apenas corados em vermelho.

A imunocitoquímica no momento zero de incubação de mastócitos e *T. gondii* não evidenciou nenhum contato ou aproximação entre estas células e ambas apresentaram-se íntegras (Fig. 68). Resultado semelhante foi observado quando o mesmo material foi analisado através do microscópio de interferência óptica, segundo Nomarski (Fig. 69).

Após 30 minutos de incubação observou-se uma interação entre mastócitos e *T. gondii*, na qual os parasitas foram vistos próximos ao limite celular dos mastócitos (Fig. 70). Após 60 minutos de incubação notou-se ausência da estrutura granular nos mastócitos, aparentemente, indicativo da ocorrência de fusão de grânulos citoplasmáticos. Encontraram-se taquizoítas próximas à superfície de mastócitos e, às vezes, em interação com mastócito, aparentemente, em processo de invasão (Figs. 71 e 72).

# *Documentação Fotográfica*

# PRANCHA 1

Eletromicrografias dos mastócitos da derme da orelha de *Calomys* controle e após 48 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*. Estudo in vivo

**FIGURA 1-** Mastócito de animal controle com citoplasma repleto de grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, exibindo conteúdo elétron-denso e homogêneo. 7 900 X.

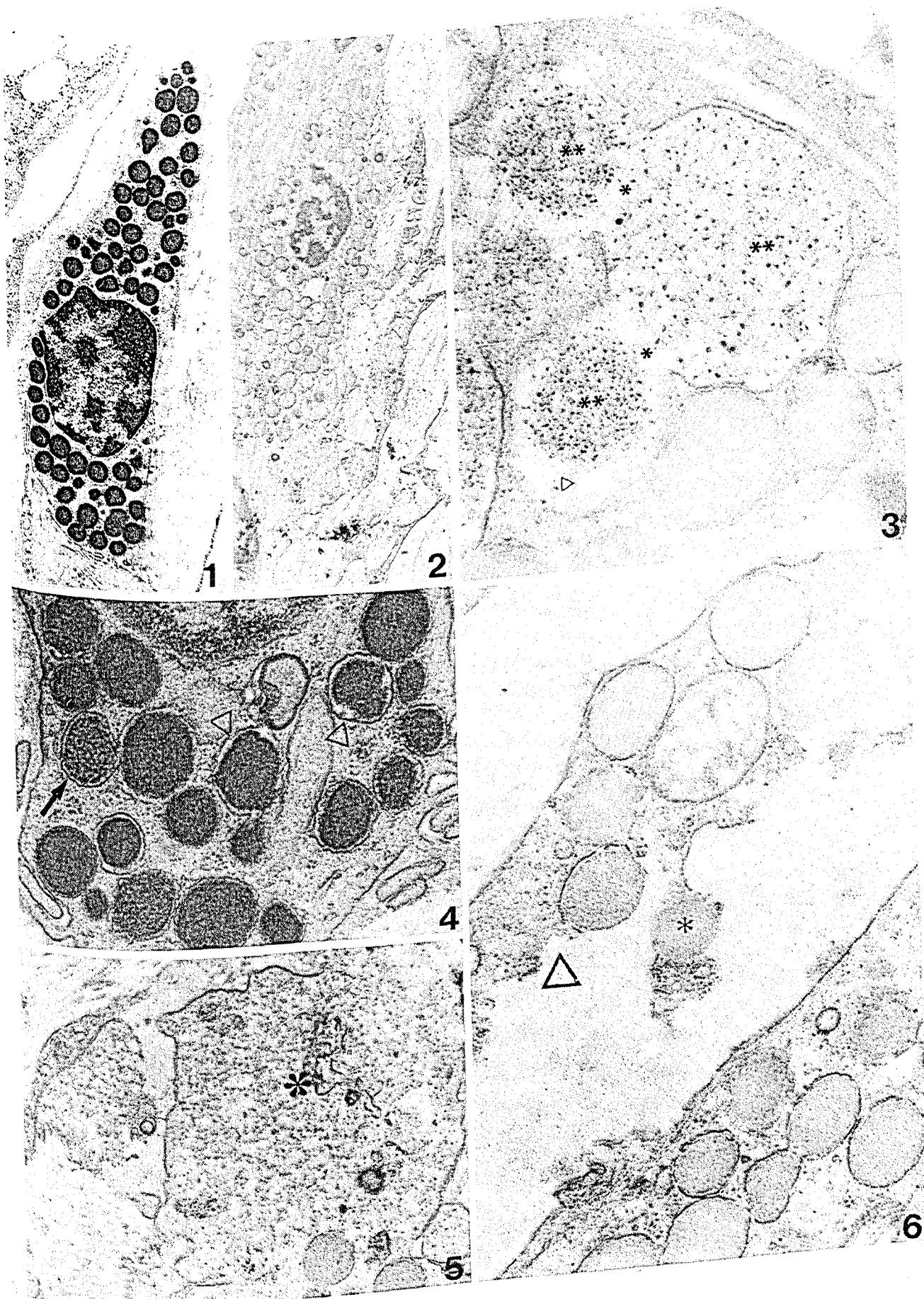
**FIGURA 2-** Mastócito de animal após 48 horas de infecção por *T. gondii*, apresentando grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, com conteúdo elétron-densidade moderada e grande canal intracitoplasmático (\*). 12 700 X.

**FIGURA 3-** Detalhes de uma região de mastócito de animal após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Notam-se fusão de grânulos (\*); grânulos com conteúdo grumoso (\*\*); e halo elétron-lúcido (▷). 52 200 X.

**FIGURA 4-** Detalhes de uma região de mastócito de animal após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Observam-se grânulos com conteúdo grumoso (→) e grânulos exibindo halo elétron-lúcido (▷). 12 700 X.

**FIGURA 5-** Detalhe do amplo canal intracitoplasmático mostrado na Fig. 4, indicativo de processo de desgranulação (\*). 20 900 X.

**FIGURA 6-** Região de um mastócito de animal após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Nota-se rompimento da membrana plasmática, com destaque para o meio extracelular.

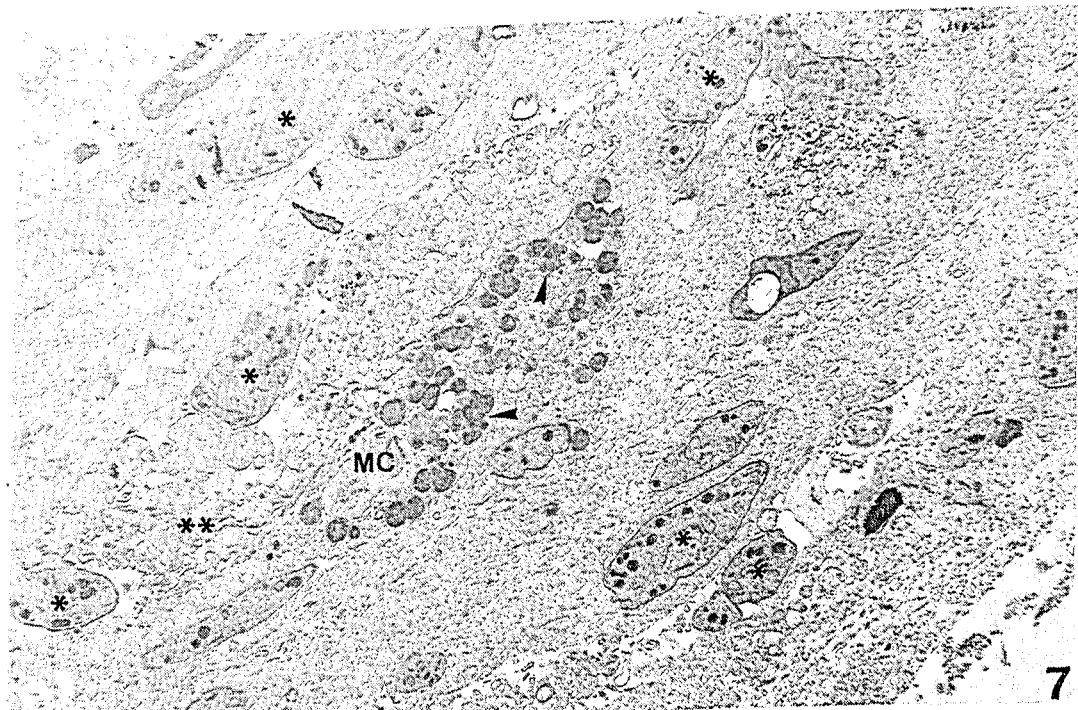


## PRANCHA 2

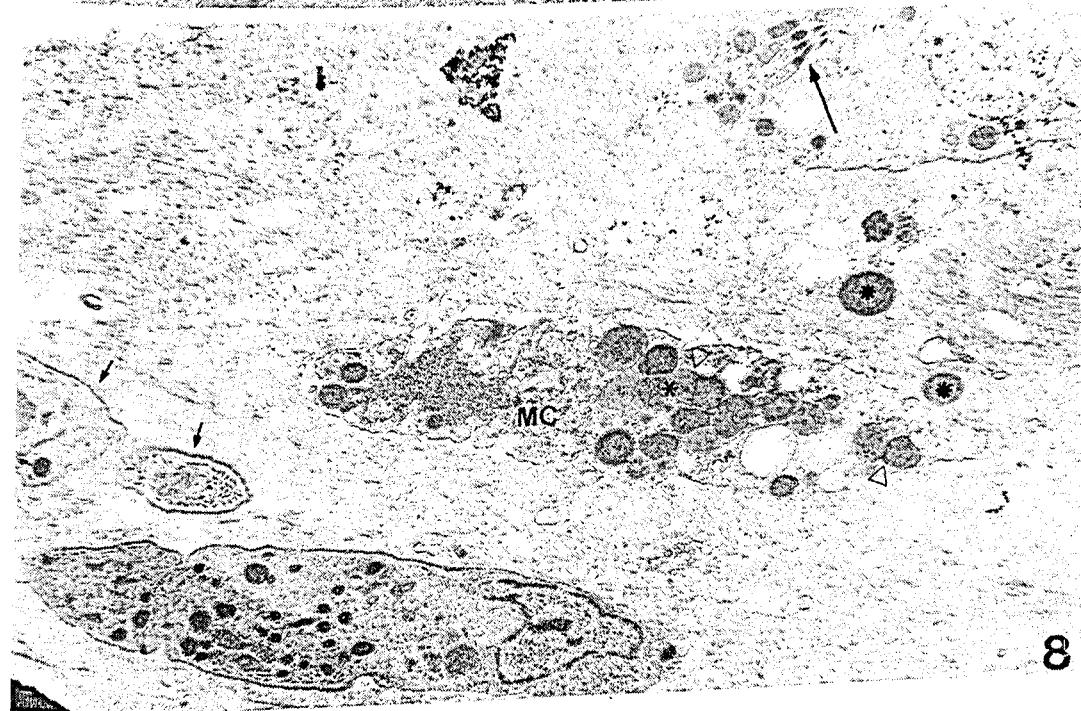
*Eletromicrografias da cápsula do fígado de Calomys callosus após 48 infecção por T. gondii. Estudo in vivo.*

**FIGURA 7-** Notam-se vários taquizoítas (\*) entre as fibrilas colágenas, mastócito (MC) apresentando fusão de grânulos citoplasmáticos (cabeça de seta) e cé (\*\*) 7 900 X.

**FIGURA 8-** Mostra mastócito (MC) apresentando fusão de grânulos (▷), canais intracitoplasmáticos (\*) e conteúdo de grânulos citoplasmáticos no meio extracelular (✿). Notam-se, também, vários taquizoítas (→) entre fibrilas colágenas e possivelmente, resquícios de roptrias (↔) destes no interior de uma célula exibindo alterações citoplasmáticas. 20 900 X.



7



8

## PRANCHA 3

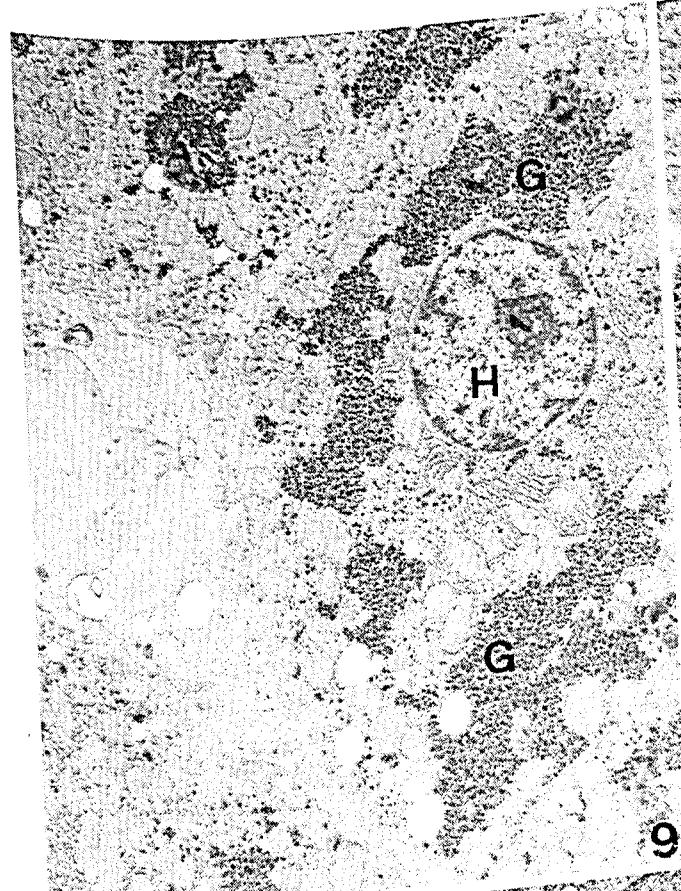
Eletromicrografias do figado de *Calomys callosus* controle e após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Estudo *in vivo*.

**FIGURA 9-** Hepatócito (H) de animal controle exibindo riqueza de glicogênio (G) e estruturas esféricas exibindo elétron-densidade moderada (\*). 6 200X.

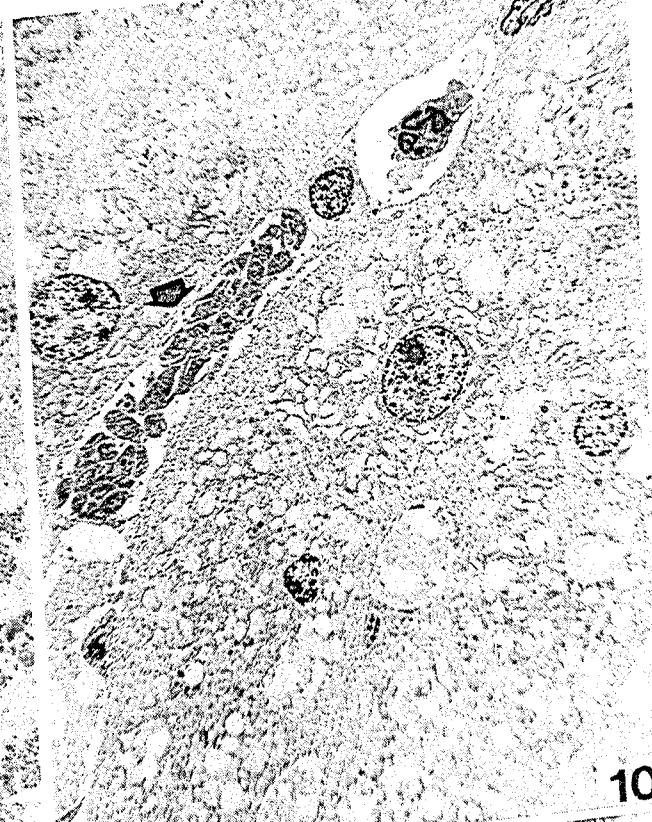
**FIGURA 10-** Mostra vários taquizoítas (♦) presentes nos capilares sinusóides. Nota-se pouca quantidade de glicogênio e muitas estruturas esféricas (\*), comparar com o animal controle da Fig. 9. 22 800 X.

**FIGURA 11-** Nota-se um leucócito (L) no interior de um capilar sinusóide com um vacúolo parasitóforo contendo um taquizoíta (★). 6 200X.

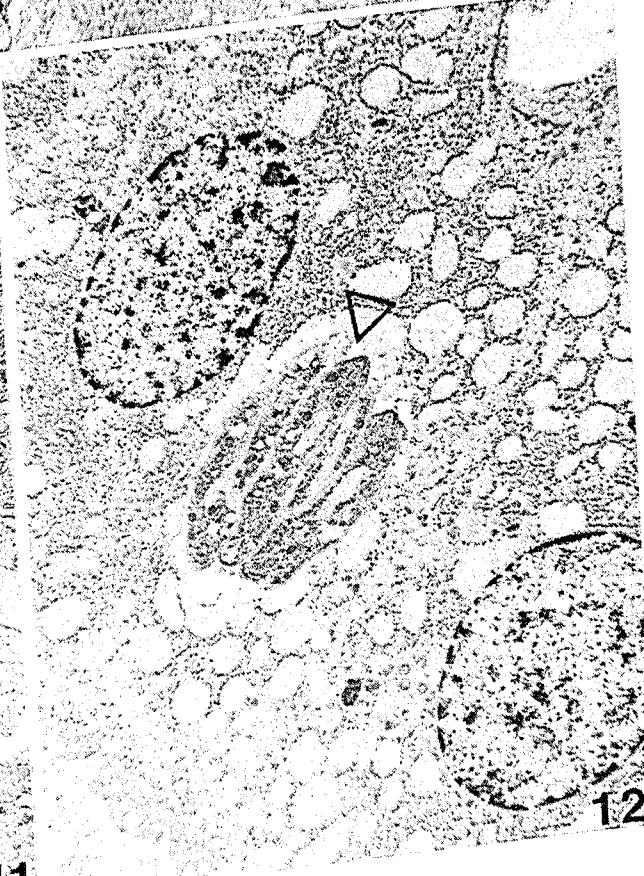
**FIGURA 12-** Mostra um vacúolo parasitóforo contendo vários taquizoítas (▷) no interior de um hepatócito. 6 200 X.



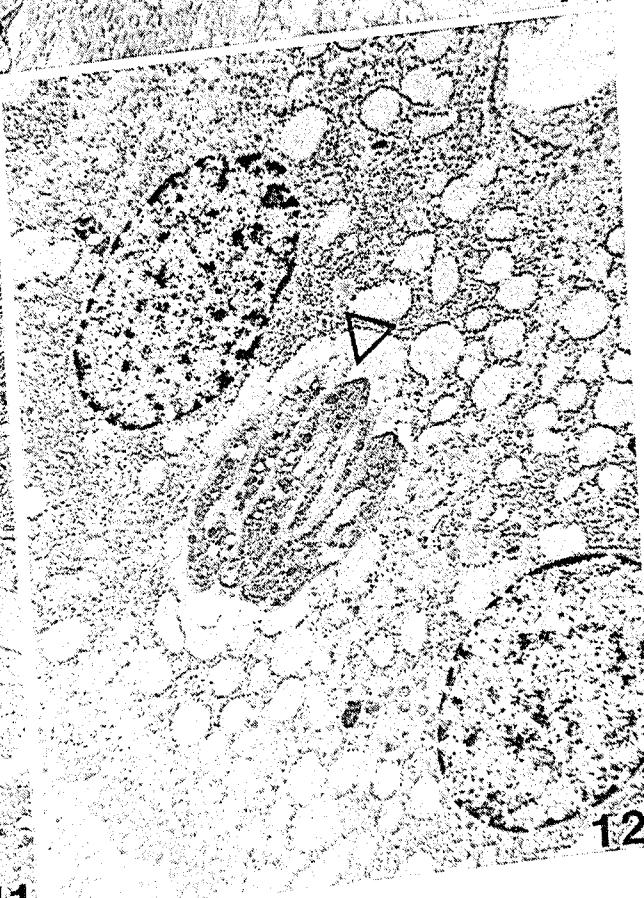
9



10



11



13

## PRANCHAS 4

Eletromicrografias do íleo de *Calomys callosus* controle e após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Estudo *in vivo*.

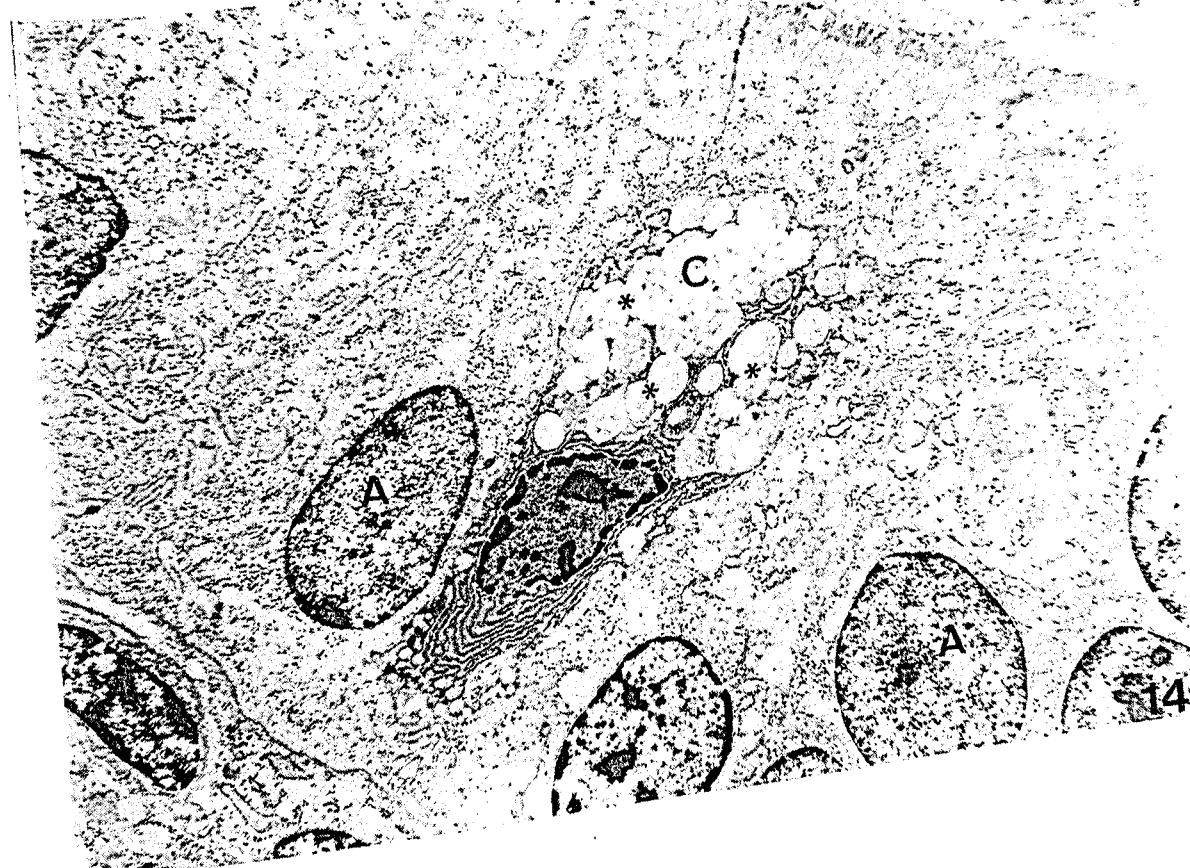
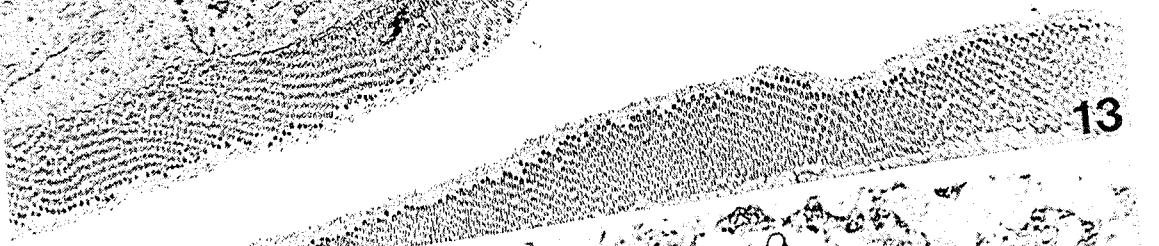
**FIGURA 13-** Panorâmica das células do epitélio da mucosa do íleo de animal controle apresentando morfologia íntegra mostrando uma célula caliciforme (C) entre várias células absorтивas exibindo numerosos microvilos (A). 6 200 X.

**FIGURA 14-** Panorâmica das células do epitélio da mucosa do íleo de animais submetidos à infecção apresentando alterações morfológicas. Notam-se: células absorтивas (A) apresentando o citoplasma vacuolizado; célula caliciforme (C) exibindo canais intracitoplasmáticos (\*). 6 200 X.

75



13



14

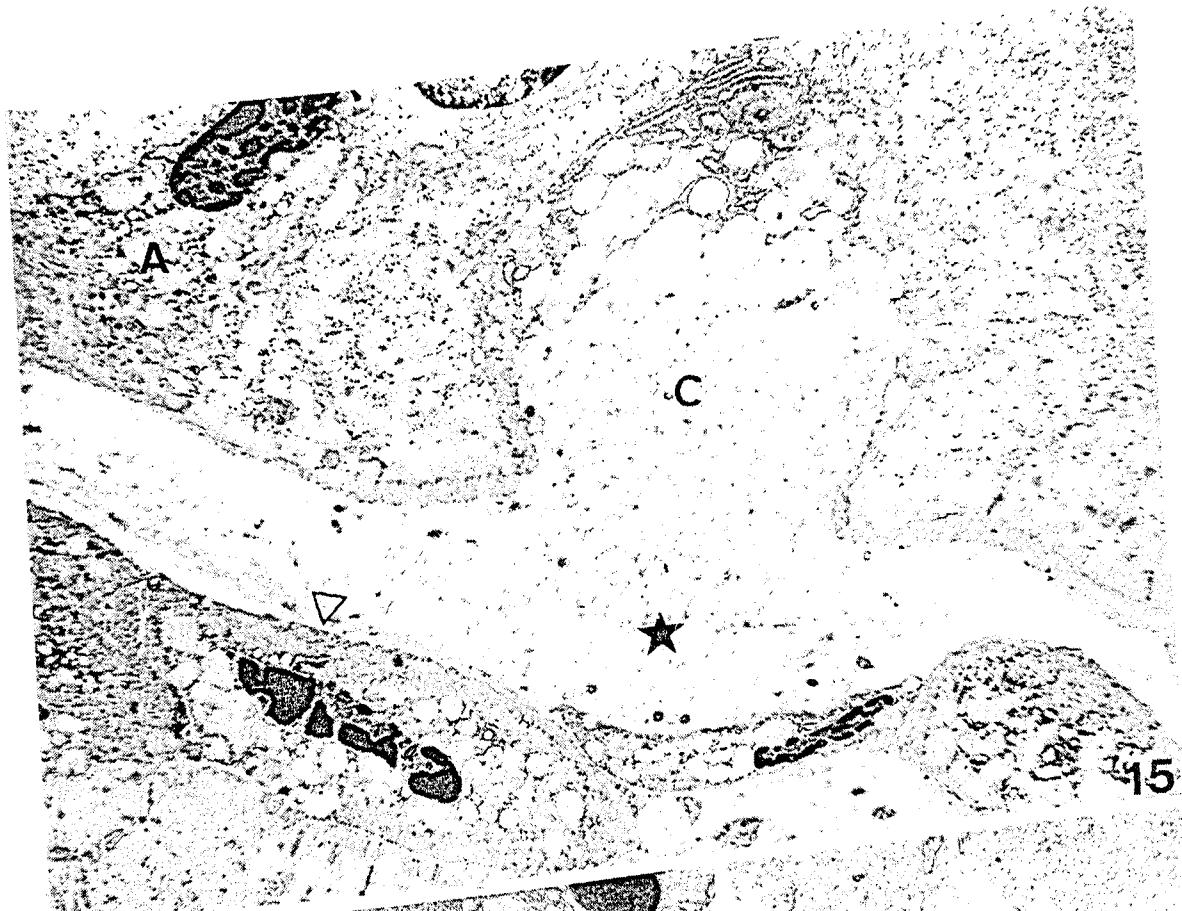
## PRANCHA 5

Eletromicrografias do íleo de *Calomys callosus* após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Estudo *in vivo*.

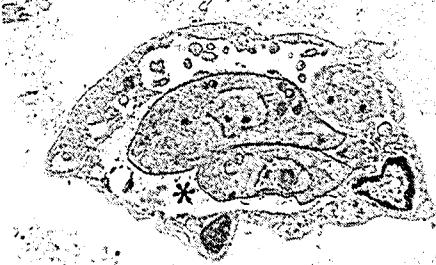
**FIGURA 15-** Mostra panorâmica das células do epitélio da mucosa do íleo de animais submetidos à infecção apresentando alterações morfológicas. Notam-se: células abortivas (A) apresentando o citoplasma vacuolizado, com núcleo fragmentado (\*), provavelmente, em processos de degeneração (>); célula caliciforme (C) com exocitose acentuada do conteúdo de seus grânulos (★). 6 200 X.

**FIGURA 16-** Mostra taquizoítas (>) livres na luz do íleo, aparentemente, em processo de divisão. 7 900 X.

**FIGURA 17-** Mostra um vacúolo parasitóforo contendo vários taquizoítas (\*) na luz do íleo. 6 000 X.



16



17

## PRANCHA 6

Eletromicrografias do íleo de *Calomys callosus* após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Estudo *in vivo*.

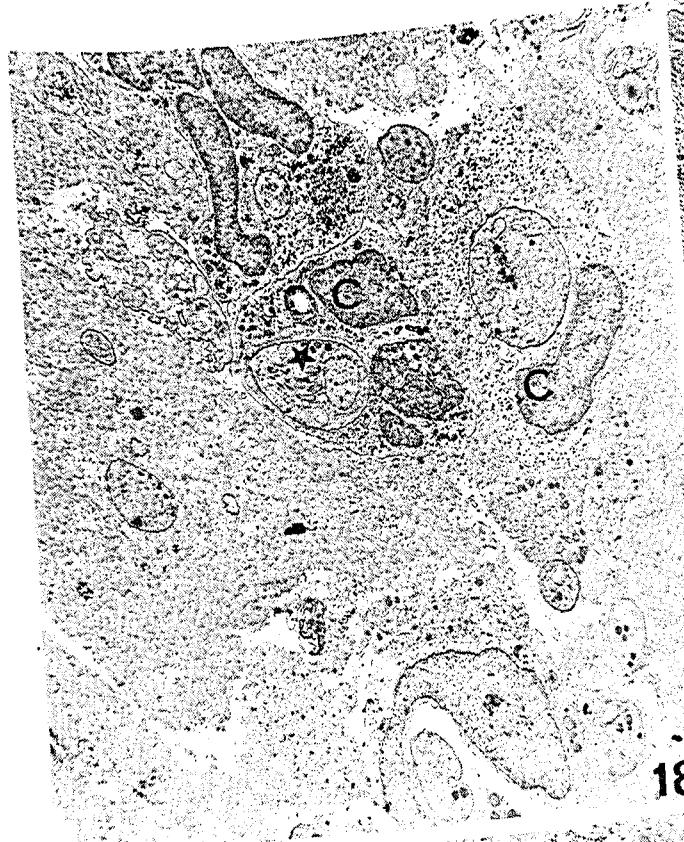
**FIGURA 18-** Mostra células (C) presentes na submucosa com vacúolo parasitóforo contendo taquizoíta (★). 5 700 X.

**FIGURA 19-** Detalhe de um dos taquizoítas mostrados na Fig. 18. Notam-se: roptrias (▷); conóide (cabeça de seta); núcleo (N); grânulos densos (☞); retículo endoplasmático granular (▲); membrana dupla (▲). 22 000 X.

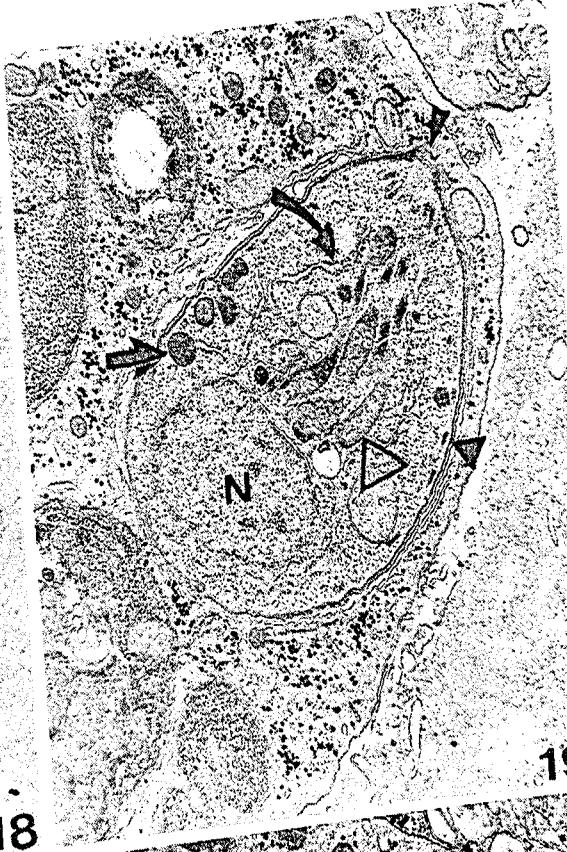
**FIGURA 20-** Notam-se vários taquizoítas (★), aparentemente, em sua maioria livres na serosa do íleo. 11 200 X.

**FIGURA 21-** Mostra um vacúolo parasitóforo contendo um taquizoíta (★) no interior de uma célula, aparentemente, um leucócito na serosa do íleo. 22 800 X.

SISBI/UFU  
201905



18



19



20



21

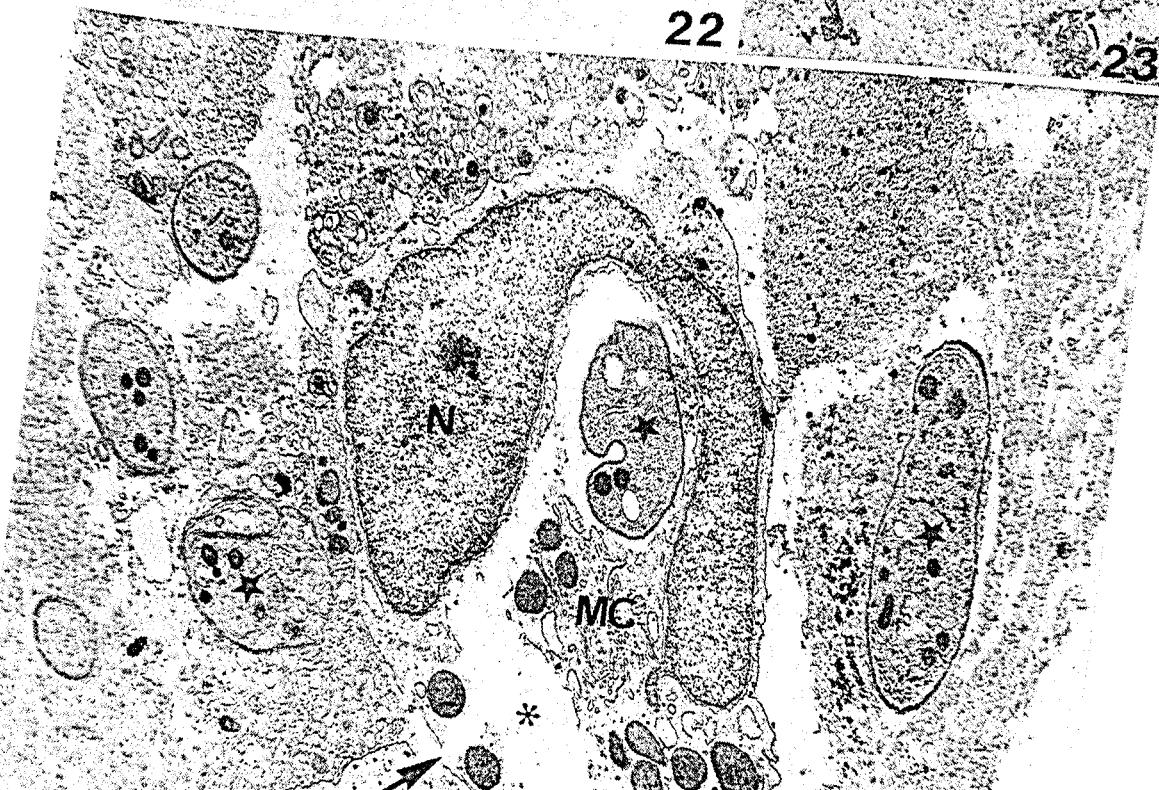
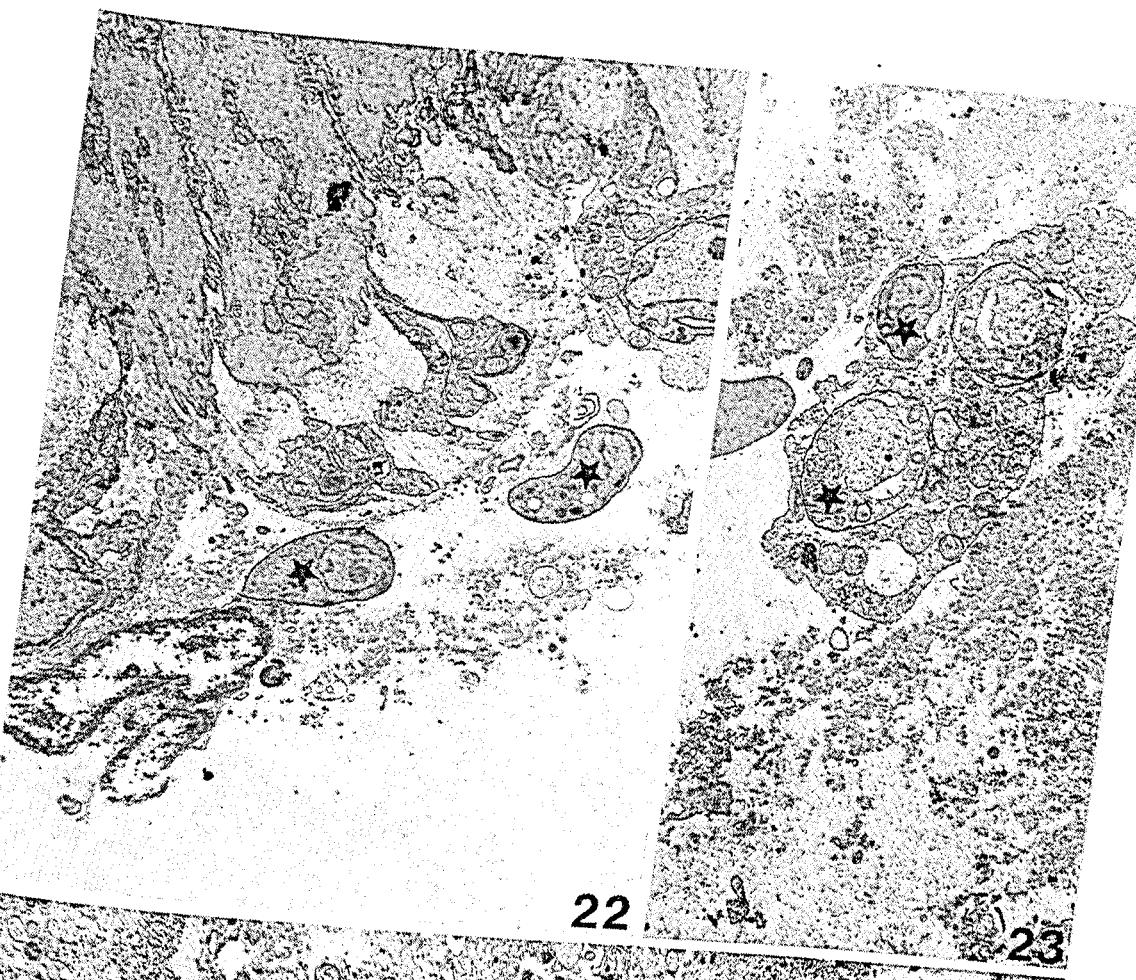
## PRANCHA 7

Eletromicrografias do íleo de *Calomys callosus* após 48 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*. Estudo *in vivo*.

**FIGURA 22-** Observa-se taquizoítas (★) entre organelas de células rompidas na serosa. 6 000 X.

**FIGURA 23-** Mostra células com vacúolo parasitóforo contendo taquizoítas mesentérico. 6 000 X.

**FIGURA 24-** Mastócito (MC) apresentando rompimento da membrana (→) em vários pontos. Notam-se também: canal intracitoplasmático (\*) na morfologia do núcleo (N); presença de taquizoítas (★) no interior do mastócito e outros taquizoítas (★) livres no tecido conjuntivo entre organelas de células rompidas. 12 200 X.



## PRANCHA 8

*Eletromicrografias de mastócitos do linfonodo submandibular e  
callosus controle. Estudo in vivo.*

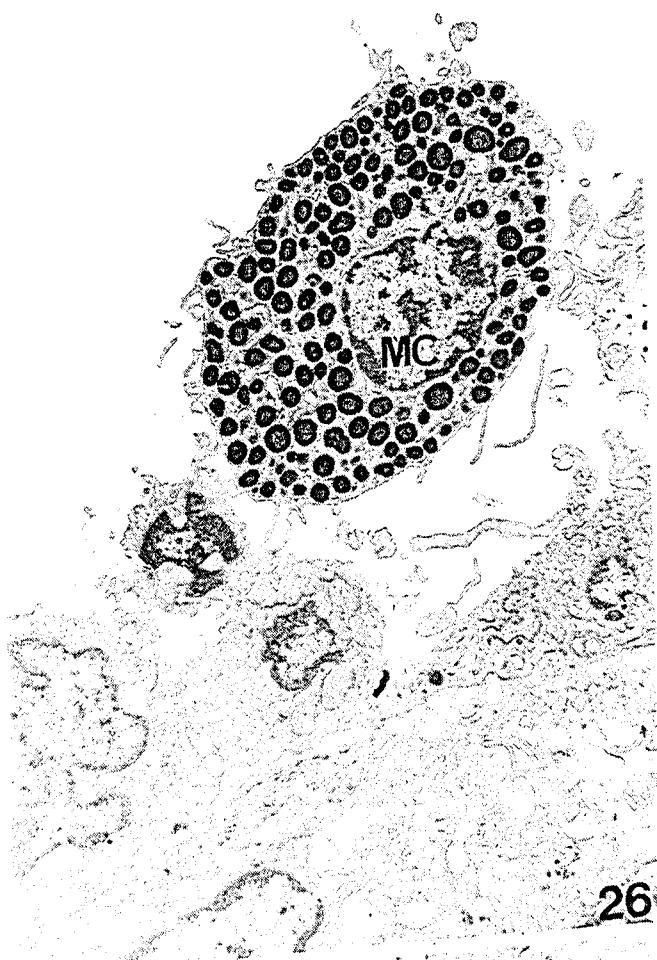
**FIGURA 25-** Mastócito (MC) no tecido conjuntivo da cápsula de animal com numerosos grânulos citoplasmáticos (\*) envoltos por nítida membrana. Exibindo conteúdo, em sua maioria, homogêneo e elétron-denso. 6 200 X. Detalhe de um dos grânulos com membrana perigranular nítida. 41 900 X.

**FIGURA 26-** Mostra um mastócito (MC) esférico encontrado no seio linfático exibindo as mesmas características descritas na Fig. 25 para mastócitos encontrados na cápsula. 7 000 X.

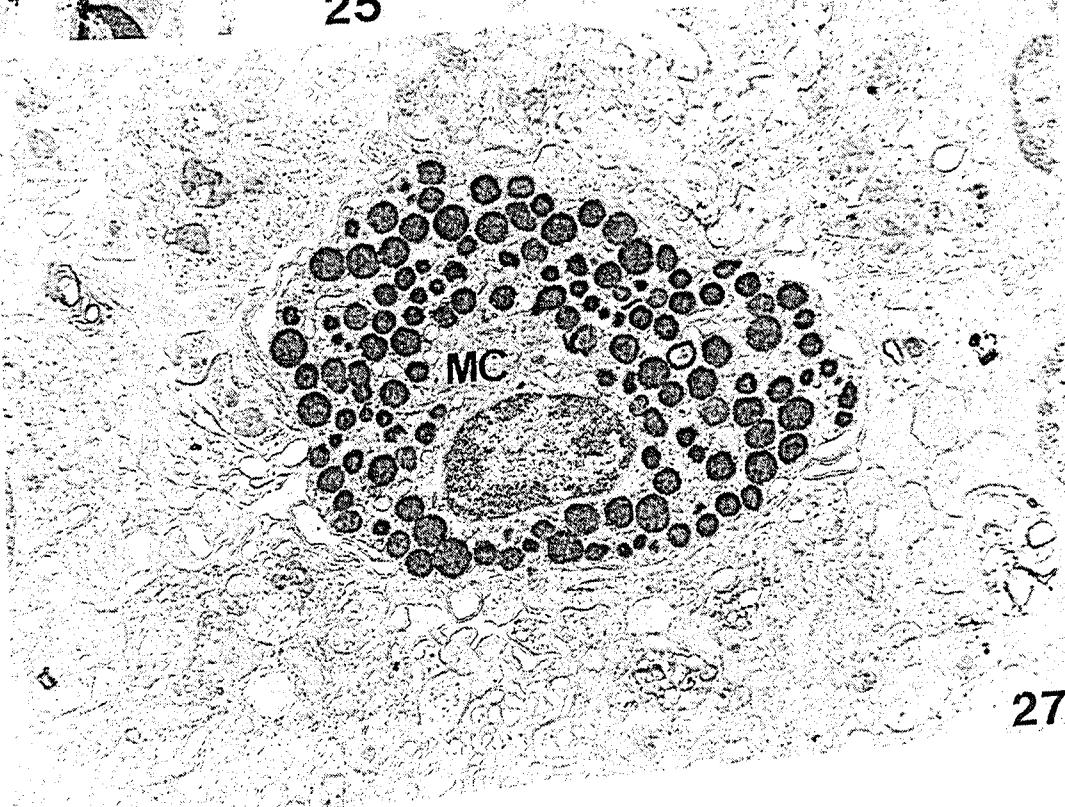
**FIGURA 27-** Mostra um mastócito (MC) esférico presente no tecido linfóide exibindo as mesmas características descritas na Fig. 25 para mastócitos encontrados na cápsula. 6 200 X.



25



26



27

## PRANCHAS 9

Eletromicrografias do linfonodo dorsal de *Calomys callosus* após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Estudo *in vivo*.

**FIGURA 28-** Mostra vários taquizoítas (♦) livres no tecido conjuntivo da cápsula. 2 100 X.

**FIGURA 29-** Nota-se um taquizoíta (★) no interior de uma célula apresentando alterações morfológicas evidentes, presente na cápsula. 11 400 X.

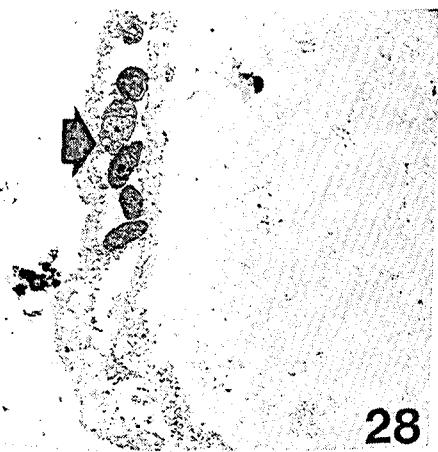
**FIGURA 30-** Detalhes do taquizoíta mostrado na Fig. 29. 37 800 X.

**FIGURA 31-** Mostra célula presente no tecido linfóide contendo taquizoítas (\*) em vacúolo parasitóforo. 11 200 X.

**FIGURA 32-** Vacúolo parasitóforo contendo vários taquizoítas (★) no interior de uma célula encontrada no seio linfático. 7 000 X.

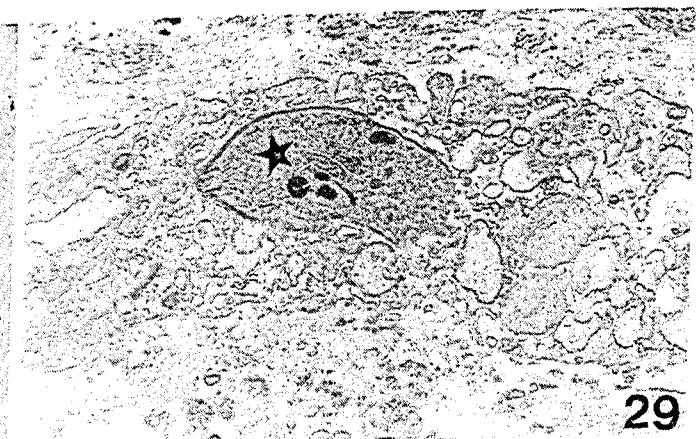
**FIGURA 33-** Mostra taquizoítas (★) livres nos seios linfáticos. 12 200 X.

80



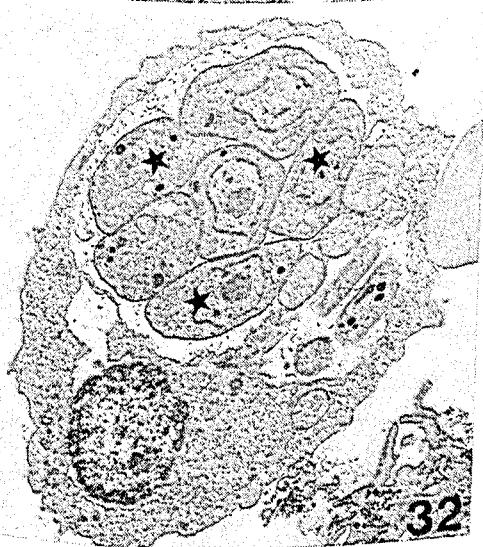
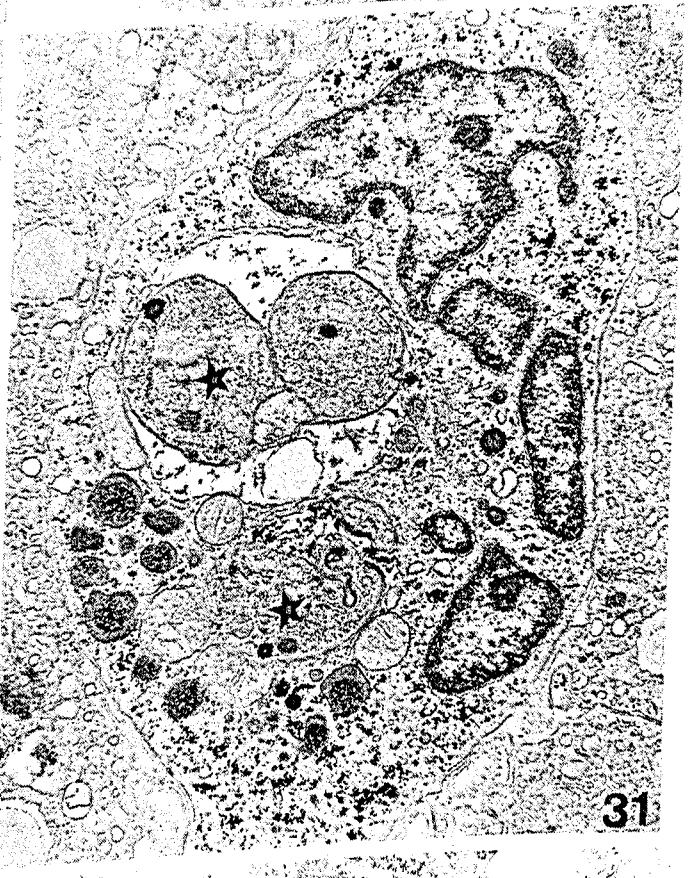
28

29



30

31



32

33

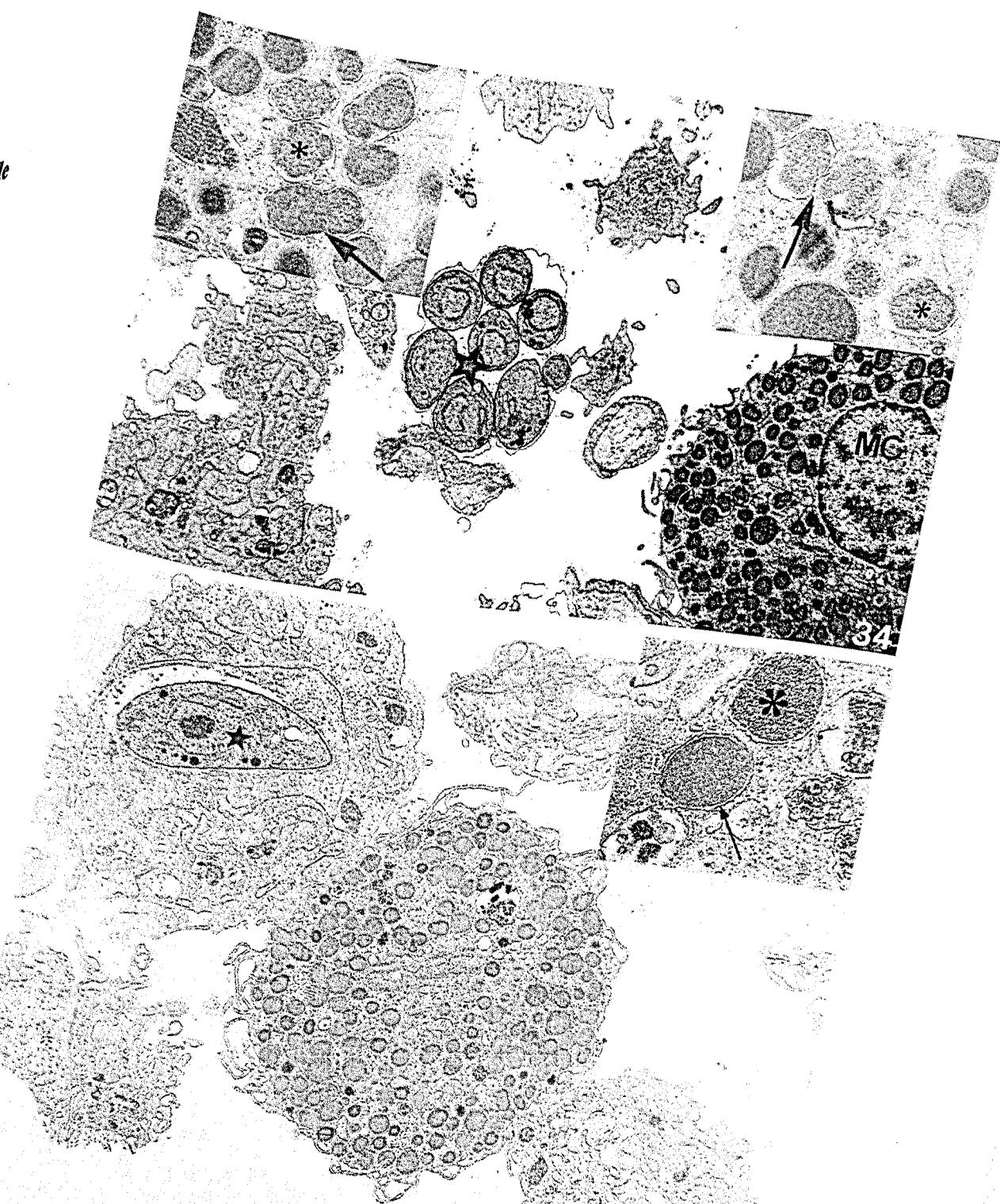


## PRANCHA 10

*Eletromicrografias do linfonodo dorsal de Calomys callosus após 48 horas infecção por T. gondii. Estudo in vivo.*

**FIGURA 34-** Mastócito (MC) exibindo grânulos citoplasmáticos, em sua maioria com conteúdo elétron-denso e homogêneo encontrado próximo a um vacúolo parasitóforo com taquizoítas (★). 5 900 X. Encartes: Detalhes de alguns grânulos (\*) deste mastócito apresentando conteúdo grumoso e halo elétron-lúcido, além da presença de fusão de grânulos (→) evidenciando, possivelmente, a ocorrência de processo de desgranulação. 21 700 X.

**FIGURA 35-** Mostra um mastócito em interação com macrófagos. Um deles contém vacúolo parasitóforo contendo taquizoíta (★). 7 000 X. Encarte: Detalhes de alguns grânulos citoplasmáticos deste mastócito exibindo conteúdo elétron-denso e homogêneo com membrana perigranular nítida (→); grânulos com conteúdo grumoso e halo elétron-lúcido (\*) bem como fusão entre estes grânulos. 37 800 X.



## PRANCHA 11

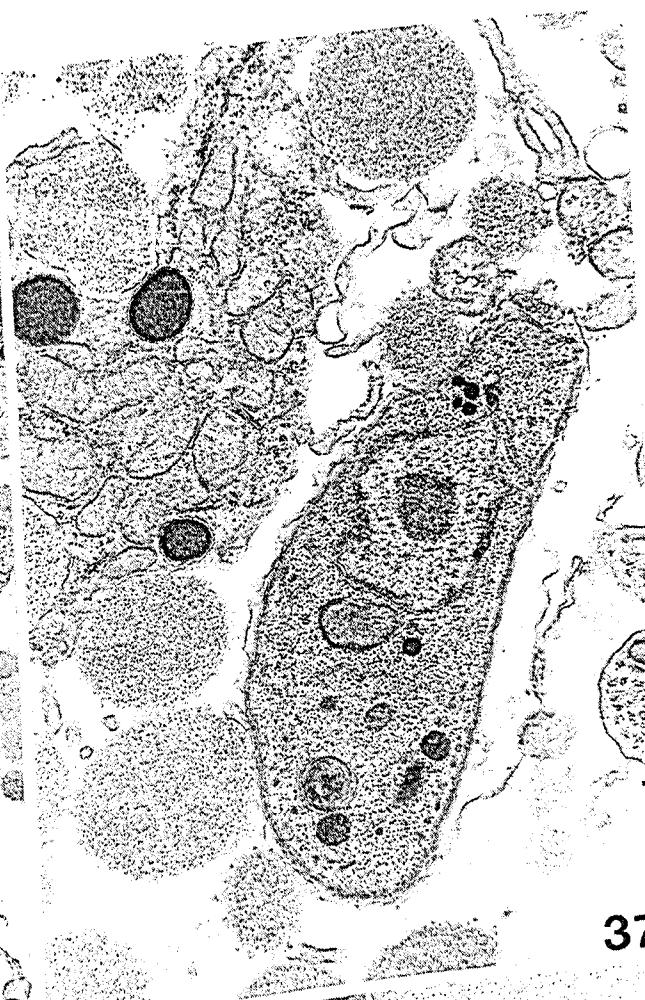
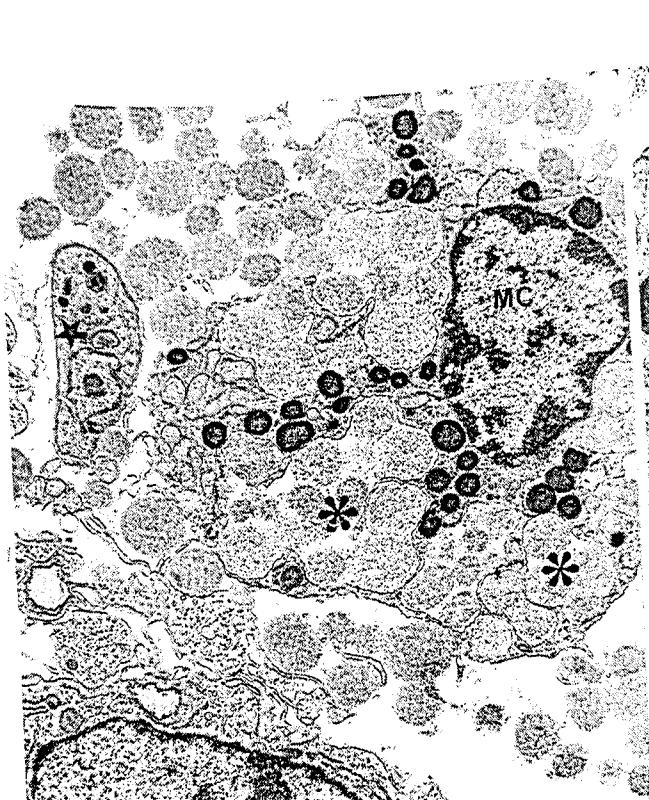
Eletromicrografias do linfonodo dorsal de *Calomys callosus* após 48 horas infecção por *T. gondii*. Estudo *in vivo*.

**FIGURA 36-** Mostra um mastócito (MC) rompido e com extrusão de grânulos citoplasmáticos que exibem, em sua maioria, conteúdo grumoso e elétron-densidade moderada. Notam-se ainda: amplos canais intracitoplasmáticos (\*); a presença de um taquizoíta (★), aparentemente, no interior desse mastócito. 7 000 X.

**FIGURA 37-** Detalhe do taquizoíta mostrado na Fig. 36. 20 500 X.

**FIGURA 38-** Mastócito (MC) no tecido linfóide apresentando grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, vazios e elétron-lúcidos (\*) e alguns fundidos formando canais de desgranulação (\*). 6 000 X.

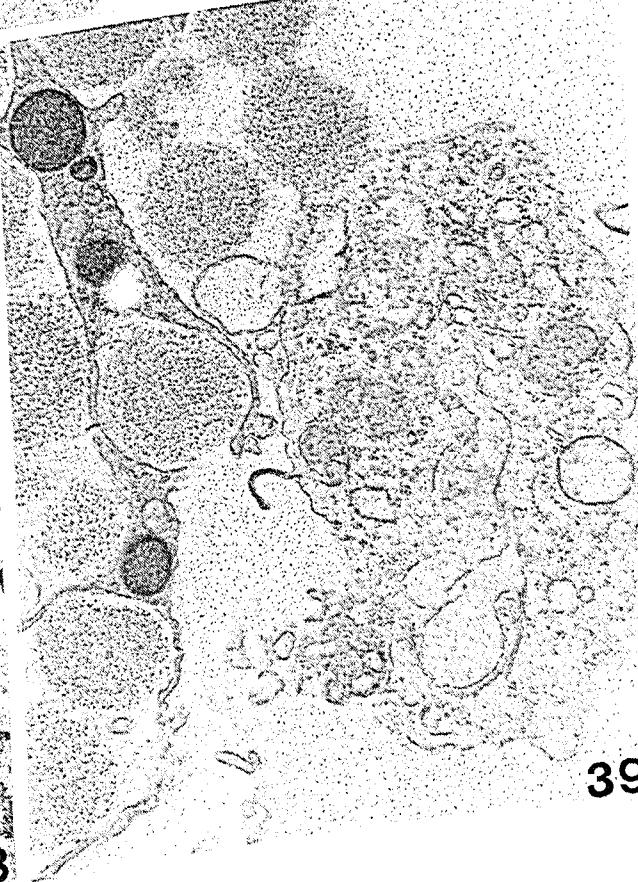
**FIGURA 39-** Mostra um taquizoíta, aparentemente, destruído em interação com um mastócito apresentando extrusão do conteúdo de grânulos citoplasmáticos que, em sua maioria, exibem conteúdo com elétron-densidade moderada evidenciando possível processo de desgranulação. 38 500 X.



36



38



39

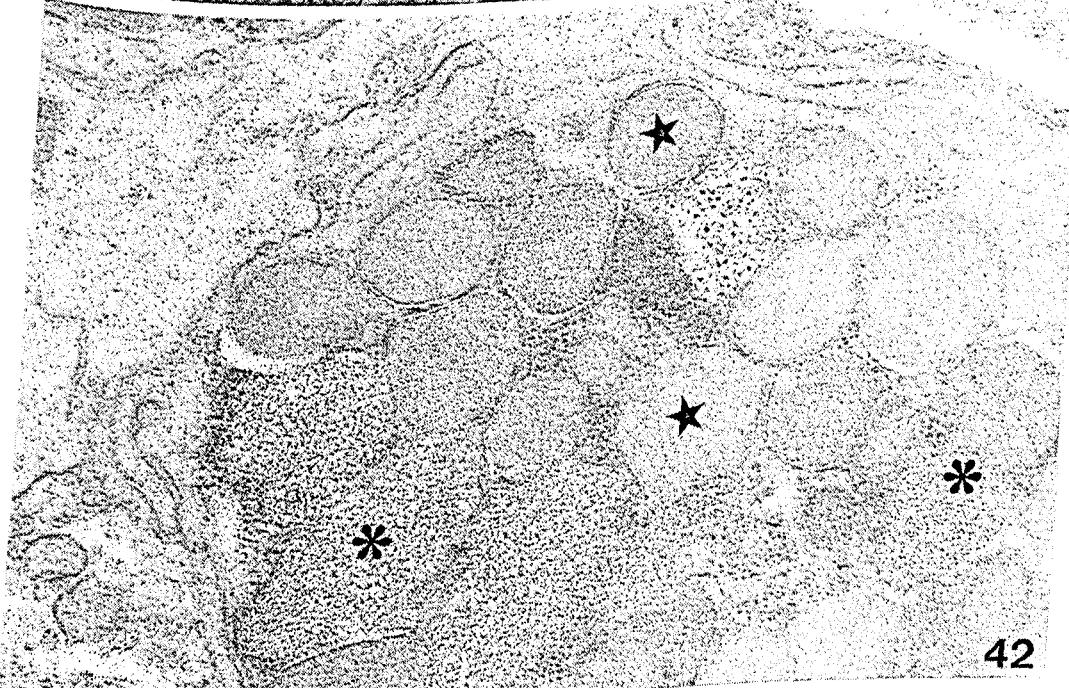
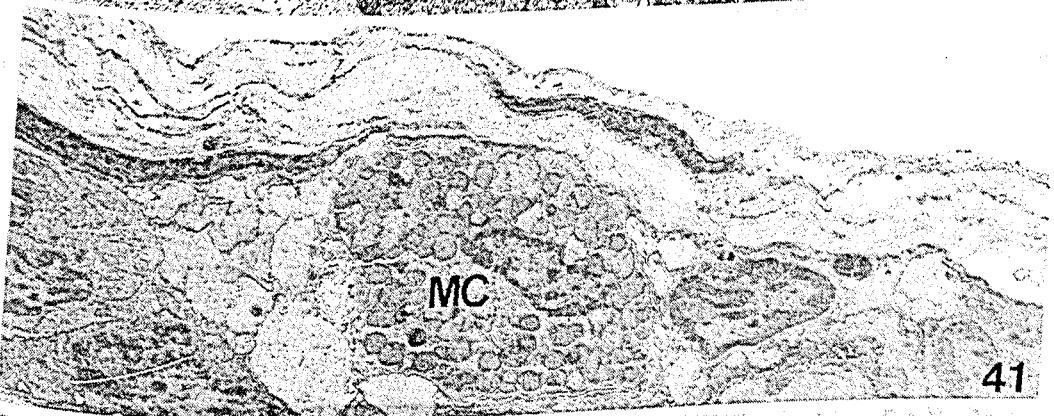
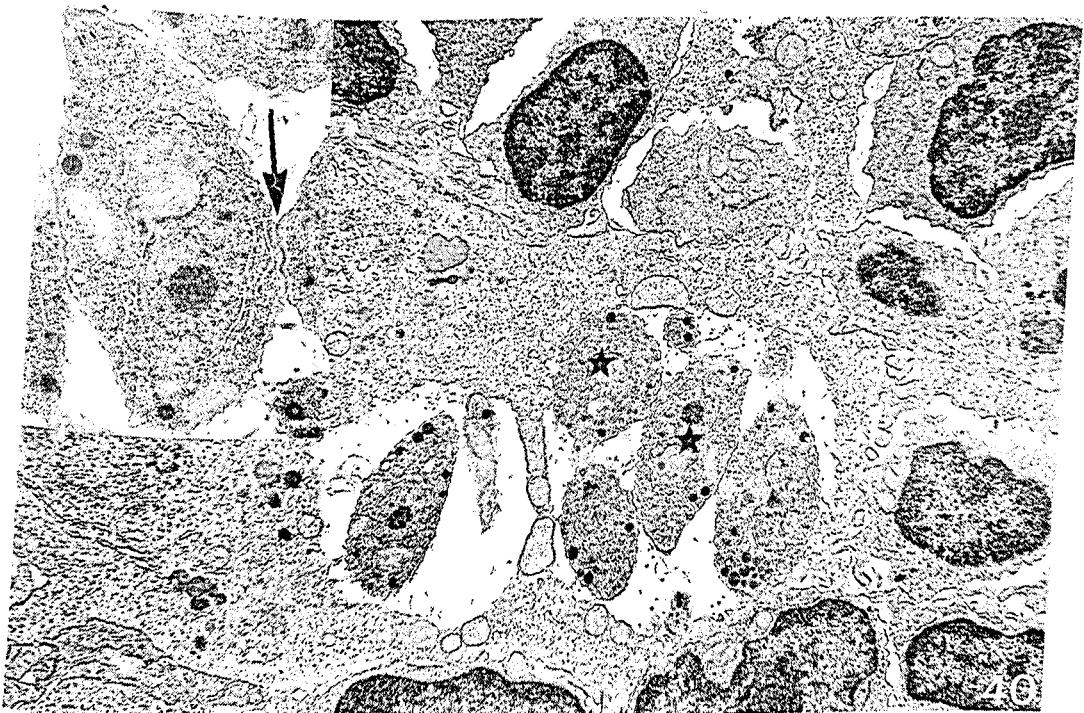
## PRANCHA 12

Eletromicrografias do linfonodo submandibular de *Calomys callosus* após 48 horas de infecção por *T. gondii*. Estudo *in vivo*.

**FIGURA 40-** Mostra a presença de células no tecido linfóide contendo vacúolo parasitóforo com vários taquizoítas (★) unidos entre si. 6 000 X. Encarte: Detalhe da união entre taquizoítas (→). 12 200 X.

**FIGURA 41-** Mastócito (MC) no tecido linfóide apresentando grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, com conteúdo grumoso e elétron-densidade moderada. 6 000 X.

**FIGURA 42-** Mastócito em seio linfático exibindo grânulos citoplasmáticos com conteúdo grumoso (\*) ou com elétron-densidade moderada (★) e a presença de grânulos citoplasmáticos fundidos formando canais intracitoplasmáticos (\*). 40 500 X.



## PRANCHA 13

Fotomicrografias de mastócitos colhidos do exudato peritoneal de *C. callosus* controle e após 12 horas de infecção por *T. gondii*. Corados com azul de toluidina e borato de sódio. Estudo *in vivo*.

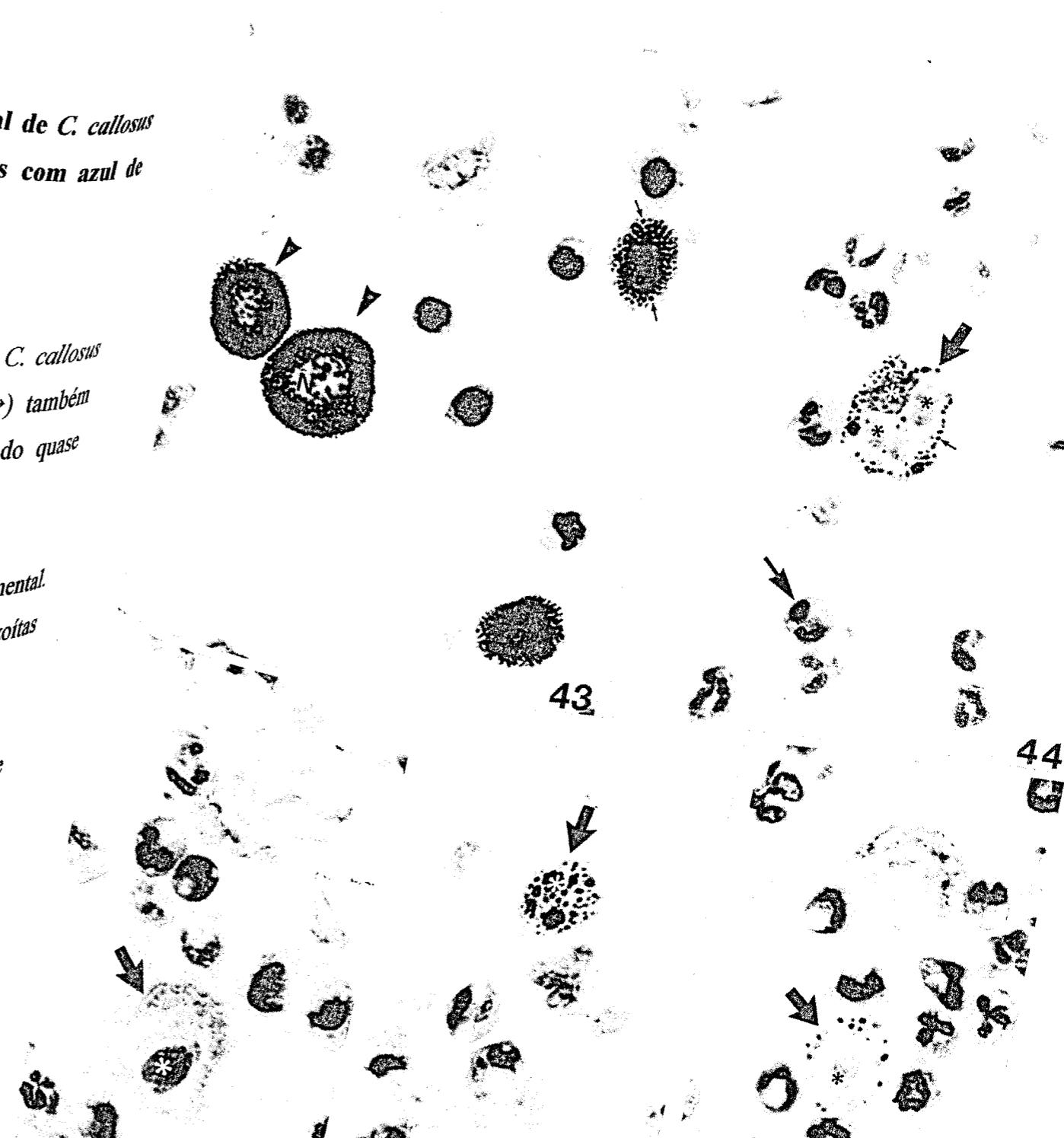


FIGURA 43- Mostra mastócitos de forma esférica (cabeça de seta) de *C. callosus* controles. Notam-se: núcleo central (N); grânulos citoplasmáticos (→) também esféricos apresentando diâmetros, aparentemente, uniformes\_preenchendo quase todo o citoplasma. 1 600 X.

FIGURA 44- Mastócito (→) de *C. callosus* submetido à infecção experimental. Observam-se: grânulos citoplasmáticos (→); vacúolo parasitóforo com taquizoítas (\*); núcleo (\*); leucócitos (→). 1 600 X.

FIGURA 45- Mostra célula de animal submetido a infecção com característica de macrófago (→) contendo no seu interior vacúolo parasitóforo com taquizoítas (\*). 1 400 X.

FIGURA 46- Mastócito (→) de *C. callosus* submetido à infecção experimental. Notam-se: grânulos citoplasmáticos de tamanhos variados exibindo forma irregular (\*); menor quantidade de grânulos. Compare com os mastócitos mostrado na Fig. 43. 1 400 X.

FIGURA 47- Mostra mastócito (→) com halo negativo sugestivo de avanço da presença de um vacúol.

## PRANCHAS 14

Eletromicrografias de mastócitos colhidos do exudato peritoneal de *C. callosus* controle e após 12 horas de infecção por *T. gondii*. Estudo *in vivo*.

**FIGURA 48-** Mostra mastócito de *C. callosus* controle. Núcleo central (N); grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, com conteúdo homogêneo e elétron-denso (>) apresentando diâmetros, aparentemente, uniformes. 6 400 X.

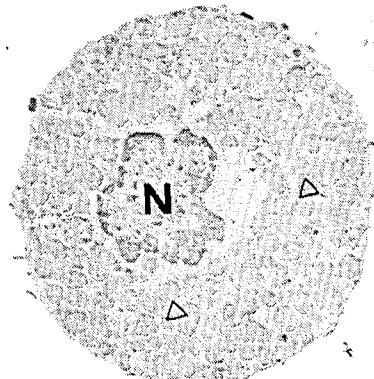
**FIGURA 49-** Mastócito de *C. callosus* submetido à infecção experimental. Notam-se: vacúolo parasitóforo com taquizoítas (★) no seu interior; amplos canais intracitoplasmáticos (\*) com conteúdo de vários grânulos; grânulos citoplasmáticos exibindo conteúdo de elétron-densidade variada (>). 5 600 X.

**FIGURA 50-** Detalhes do canal intracitoplasmático (\*) e de grânulos com conteúdo grumoso e elétron-densidade moderada (>) mostrados na Fig. 49. 22 800 X.

**FIGURA 51-** Mostra mastócito de *C. callosus* submetido à infecção experimental apresentando grânulos citoplasmáticos exibindo conteúdo elétron-lúcido (\*), às vezes, fundidos formando canais intracitoplasmáticos (\*), ao lado de raros grânulos citoplasmáticos exibindo elétron-densidade moderada (>). Compare esse mastócito com o mostrado na fotomicrografia da Fig. 47. 7 000 X.

**FIGURA 52-** Célula de *C. callosus* submetido à infecção experimental apresentando vacúolo parasitóforo contendo taquizoítas (★) exibindo núcleo vacuolizado. 11 400 X.

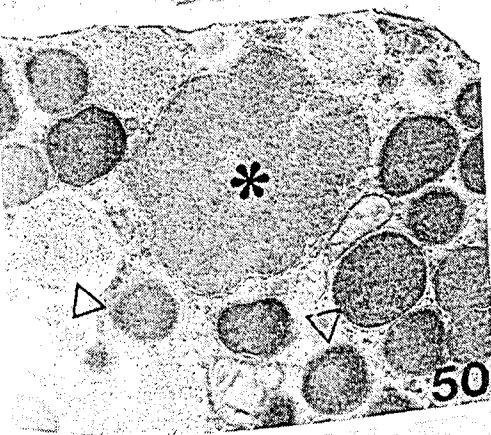
**FIGURA 53-** Mostra uma célula de *C. callosus* submetido à infecção experimental em interação com um taquizoíta (★) aparente. 11 400 X.



48



49



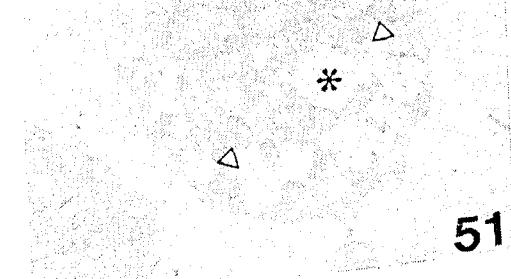
50



52



53



51

## PRANCHA 15

Eletromicrografias de mastócitos colhidos do exudato peritoneal de *C. callosus* e taquizoítas. Estudo *in vitro*.

**FIGURA 54-** Mostra mastócito na ausência de taquizoítas de *T. gondii* apresentando sua morfologia íntegra e grânulos citoplasmáticos também integros, exibindo conteúdo homogêneo. Núcleo (N); grânulos citoplasmáticos (\*); projeções citoplasmáticas (→). 8 000 X.

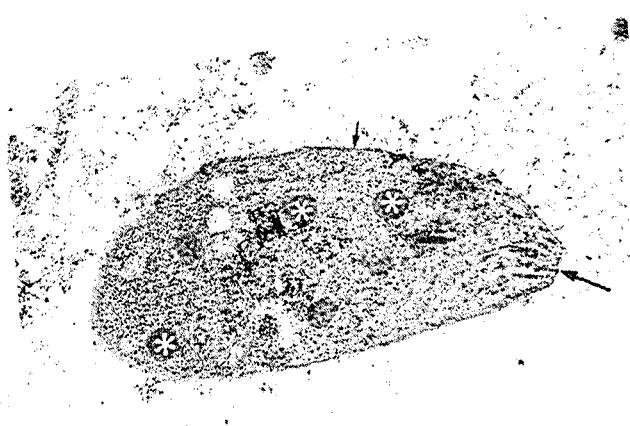
**FIGURA 55-** Taquizoíta colhido no momento zero de incubação com mastócitos. Nota-se sua morfologia íntegra. Conóide (→); grânulos densos (\*); membrana (→). 20 500 X.

**FIGURA 56-** Mostra mastócito após 30 minutos de incubação com *T. gondii*. Notam-se: vacúolo parasitóforo intracelular com taquizoíta (★); aumento na quantidade de projeções citoplasmáticas (→). 5 600 X.

**FIGURAS 57 e 58-** Região de mastócito após 30 minutos de incubação com *T. gondii*. Observam-se: grânulos com conteúdo grumoso e elétron-densidade moderada (\*); halo elétron-lúcido entre o conteúdo do grânulo e sua superfície (→); projeções citoplasmáticas mais longas (→). 7 000 X.

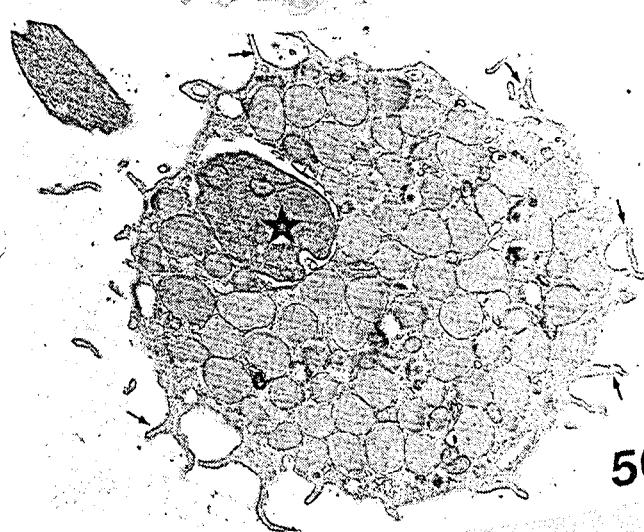
**FIGURA 59-** Mostra um mastócito (MC) após 30 minutos de incubação com *T. gondii* estabelecendo, aparentemente, interação com um parasita (★). Nota-se aumento na quantidade de projeções citoplasmáticas (→) do mastócito na face de contato com o taquizoíta. 5 600 X.

**FIGURA 60-** Detalhe da interação

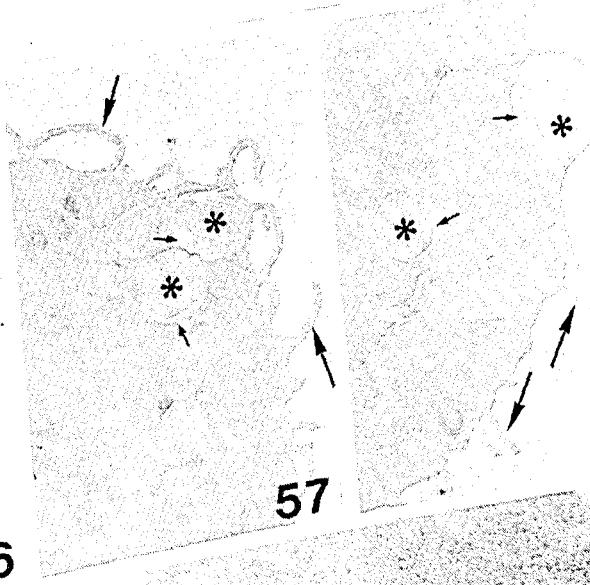


55

54

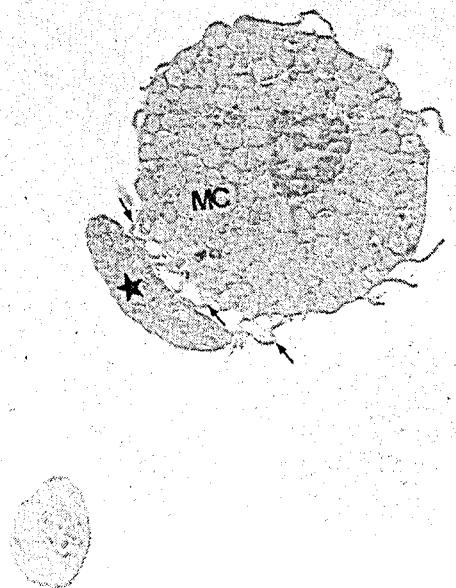


56



57

58



59



60

## PRANCHA 16

*Eletromicrografias de mastócitos colhidos do exudato peritoneal de C. callosus e taquizoítas de T. gondii. Estudo *in vitro*.*

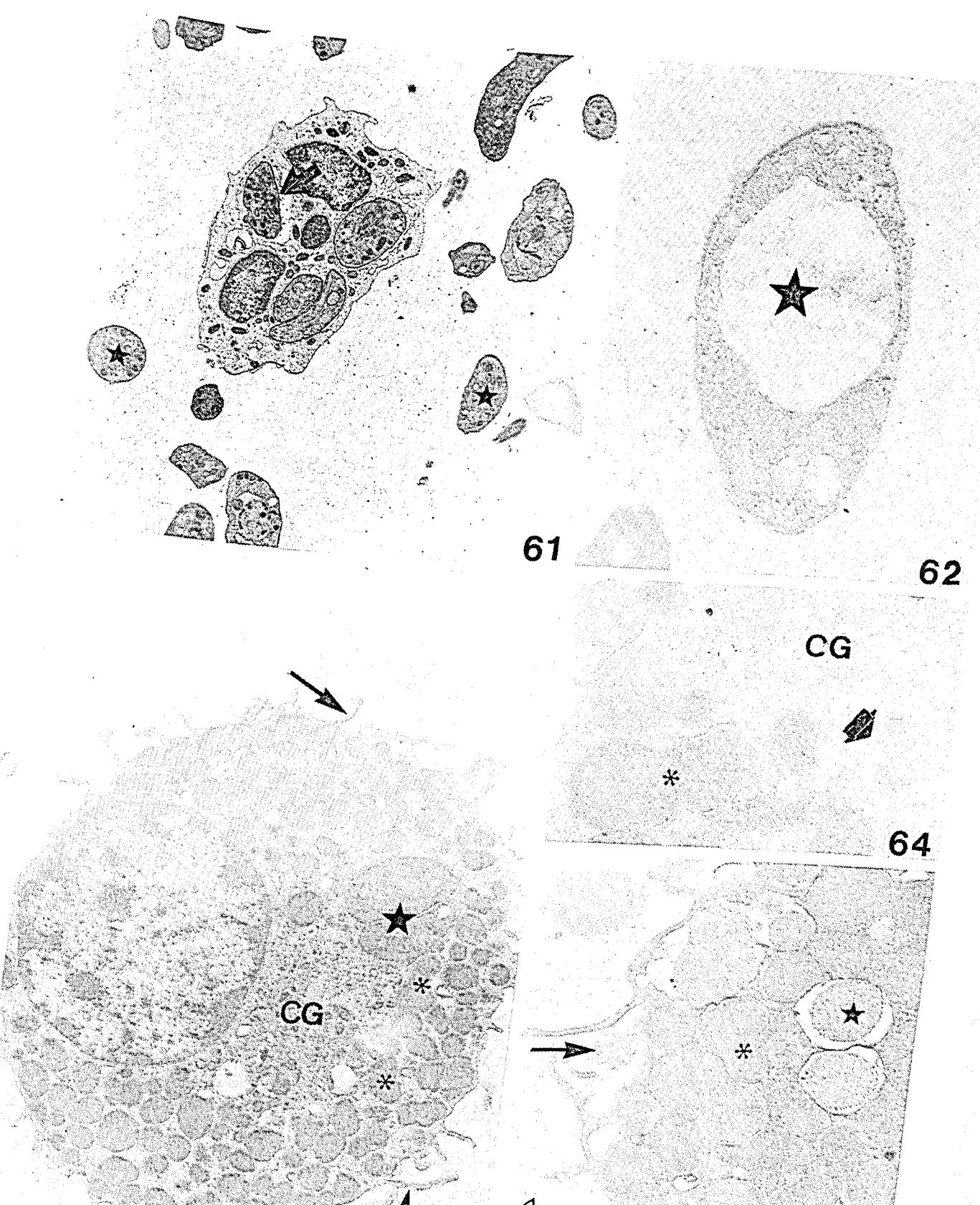
**FIGURA 61-** Mostra taquizoítas livres (★) e em vacúolos parasitóforos (⇒) dentro de eosinófilo, após 30 minutos de incubação com mastócito. 11 400 X.

**FIGURA 62-** Taquizoíta livre exibindo um amplo vacúolo (★) e diminuição de eletrôn-densidade, sinais indicativos de alteração na morfologia deste parasita após 30 minutos de incubação com mastócito. 20 500 X.

**FIGURA 63-** Apresenta um mastócito, após 60 minutos de incubação com *T. gondii*, apresentando um vacúolo parasitóforo contendo taquizoítas (★). Notam-se: aumento na quantidade de projeções citoplasmáticas (→); região de Complexo de Golgi bem evidente (CG); fusão de grânulos (\*). 11 400 X.

**FIGURA 64-** Detalhes de uma região do Complexo de Golgi (CG) de um mastócito, após 60 minutos de incubação com *T. gondii*. Observam-se: fusão de grânulos (\*); pró-grânulo (♦). 37 800 X.

**FIGURA 65-** Mostra detalhes de uma região de um mastócito, após 60 minutos de incubação com *T. gondii*. Notam-se: fusão de grânulos citoplasmáticos (\*); grânulos exibindo conteúdo pouco eletron-denso e baixa densidade (→); pro-



## PRANCHA 17

Fotomicrografias de mastócitos peritoneais de *C. callosus* e *T. gondii* processados *in vitro* com técnica imunocitoquímica documentação fotográfica foi realizada no Microscópio Confocal 69 que foi feita através do Microscópio de interferência óptica Nomarski.

**FIGURA 66-** Mostra um taquizoíta no momento zero de incubação com anticorpo policlonal de camundongo.

**FIGURA 67-** Taquizoíta no momento zero de incubação tratado com anticorpo monoclonal de camundongo.

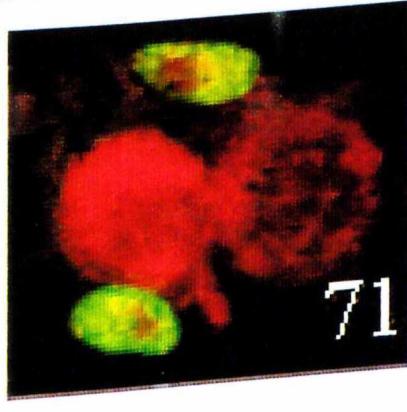
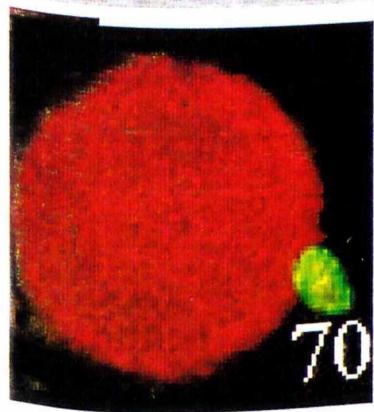
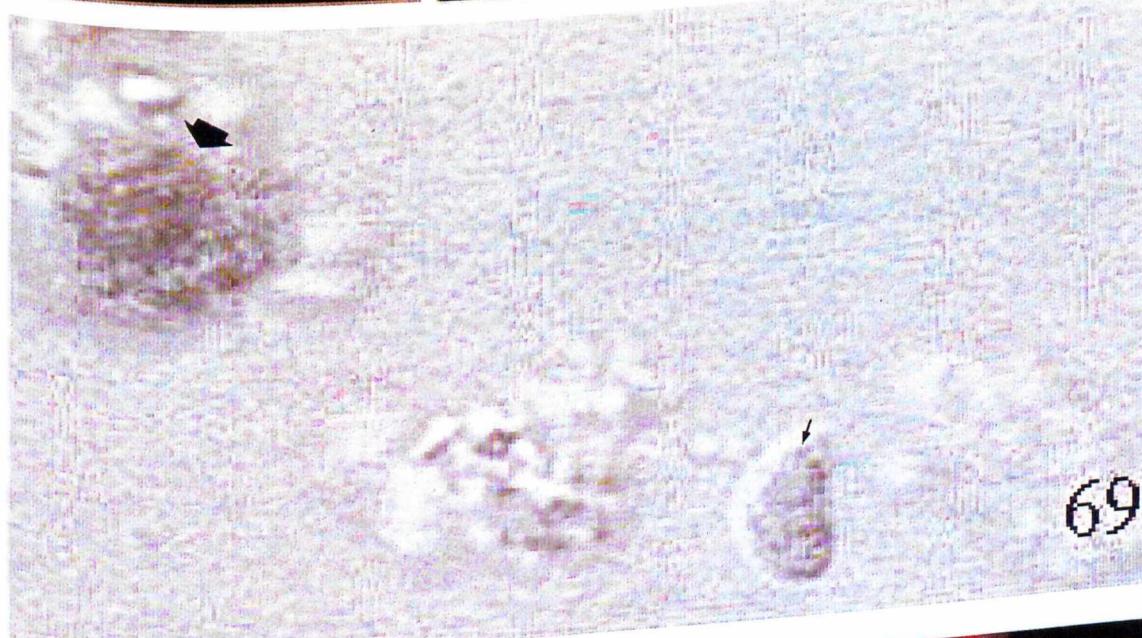
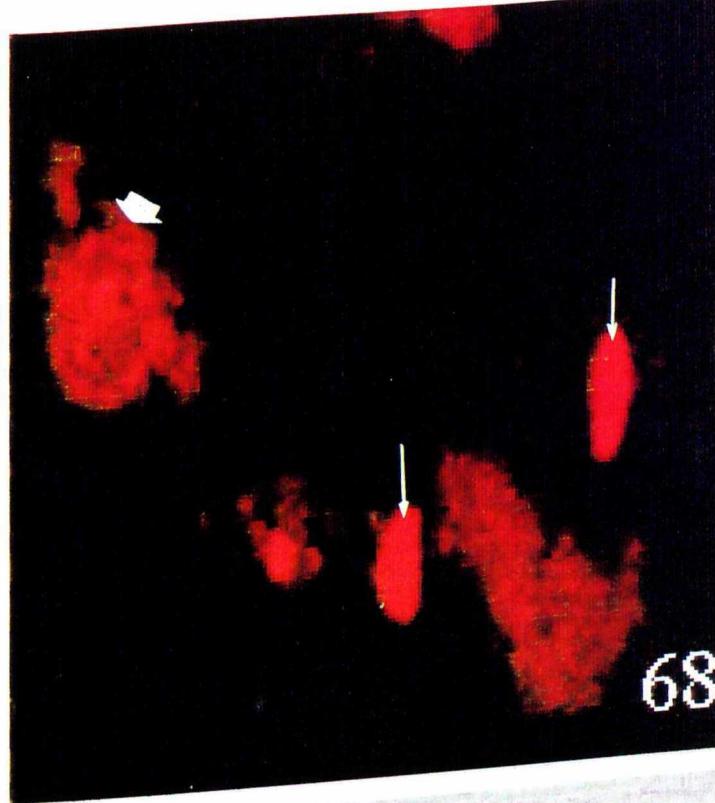
**FIGURA 68-** Mostra taquizoítas (→) e mastócitos (♦) no momento zero de incubação tratados com soro não imune de camundongo.

**FIGURA 69-** Taquizoítas (→) e mastócitos (♦) no momento zero de incubação tratados com anticorpo policlonal de camundongo.

**FIGURA 70-** Taquizoítas (em verde) com seu núcleo (em vermelho) e mastócitos (em vermelho) após 30 minutos de incubação tratados com anticorpo policlonal de camundongo. Nota-se o mastócito repleto de grânulos citoplasmáticos.

**FIGURA 71-** Taquizoítas (em verde) com seu núcleo (em vermelho) e mastócitos (em vermelho) após 60 minutos de incubação tratados com anticorpo policlonal de camundongo. Observa-se ausência da estrutura granular citoplasmática com coloração mais evidente.

**FIGURA .**



# *Discussão*

## 7.- Discussão

*Calomys callosus* após 48 horas de infecção por  $10^5$  taquizoítas apresentam-se prostrados e chegam a óbito, aproximadamente, com 50 horas de infecção. O que sugere que esta espécie seja mais suscetível a infecção por *T. gondii* do que camundongos OF1 que sobrevivem até 6 dias após infecção por  $10^5$  taquizoítas (ZENNER et al., 1998). Os resultados do presente trabalho estão de acordo com o descrito por FAVORETO et al., (1998) pois estes autores afirmam que *C. callosus* adultos podem ser classificados como animais, altamente, sensíveis à infecção por *T. gondii* e o consideram um excelente modelo experimental para se estudar a fase aguda da infecção por este parasita. Estudaram, ainda, a mortalidade de *C. callosus* após infecção com diferentes quantidades de *T. gondii* inoculados, intraperitonealmente, de  $10^2$  a  $10^6$  parasitas quando todos os animais morrem entre o 3º e o 9º dia.

Pela primeira vez, estudou-se mastócitos de *C. callosus*, e observou-se uma homogeneidade morfológica entre eles em diferentes órgãos ou locais estudados no presente trabalho: grânulos dispersos no citoplasma que não fazem saliência na membrana plasmática, nem alojam-se em depressões da membrana nuclear e não exibem denteações, ao contrário, do descrito por outros autores. CHIARINI-GARCIA et al. (2000) estudando mastócitos de seios linfáticos do linfonodo axilar do gambá *Didelphis albiventris*, observaram diferenças marcantes em relação ao observado em *C. callosus*. Naquele modelo o citoplasma apresentava-se repleto de grânulos que fazem saliência na sua superfície e possuem denteações. Esta presença de denteações nos grânulos citoplasmáticos conferindo-lhes a forma de cesta são característicos na cobaia e gambá *D. albiventris*, freqüentes no cão, raros no homem e nunca encontrados no rato (BEHRENDT et al., 1978; SANTOS & MACHADO, 1994).

A derme da orelha apresenta mastócitos exibindo grânulos, aparentemente, semelhantes no tamanho com conteúdo homogêneo e elétron-denso. Assim como os

mastócitos da orelha do gerbil da Mongólia, exceto pela grande quantidade de projeções citoplasmáticas presentes no gerbil da Mongólia (NAWA et al., 1994).

Após 48 horas de infecção o parasita encontra-se disseminado por todos os órgãos estudados de *C. callosus*: fígado, íleo e linfonodos submandibular e dorsal, exceto na orelha. Os mastócitos da derme da orelha de animais infectados apresentam alterações morfológicas claras na maioria dos mastócitos da derme indicativos de processo de desgranulação. Tais alterações, ocorridas também nos mastócitos dos demais órgãos estudados no presente trabalho, são semelhantes às descritas em eutérios sob o efeito do composto 48/80 (NAWA et al., 1994) e no gambá *D. albiventris* (CHIARINI-GARCIA, 1995; SANTOS, 1996; FERREIRA, 1997). Estes resultados sugerem que mesmo sem a detecção do parasita, as alterações observadas nos mastócitos dos animais infectados podem ter ocorrido em resposta à infecção por *T. gondii*.

No presente trabalho não se investigou a cinética da infecção dos órgãos por *T. gondii*, porém observa-se no fígado, após 48 horas de infecção, a presença de taquizoítas na cápsula, nos capilares sinusóides e no tecido conjuntivo. Entretanto, ZENNER et al. (1998) analisaram vários órgãos de camundongos OF1 após infecção por *T. gondii* e descrevem que baço, linfonodo mesentérico e diafragma estavam infectados no 2º dia, pulmão e coração no 3º dia e o fígado no 4º dia pós-infecção. Modelos experimentais de toxoplasmose têm sido desenvolvidos em animais de laboratório para se estudar os vários aspectos desta doença. Como descrito em outras doenças parasitárias, a patologia da infecção por *T. gondii* resulta de uma interação entre parasitas e fatores do hospedeiro. Isto gera dificuldades em comparar alguns dados discordantes de diferentes laboratórios: modelos experimentais diferentes; a cepa do *T. gondii*; a rota de infecção e as condições experimentais (ZENNER et al., 1998). Estes resultados são discordantes dos dados do presente trabalho uma vez que, neste último os animais chegam a óbito no 3º dia de infecção, ou seja, a infecção do fígado ocorre antes do 3º dia.

Sendo a infecção via intraperitoneal, supõe-se que os parasitas invadem o mesentério e, subsequentemente, seus órgãos adjacentes incluindo o íleo. Este, provavelmente, é invadido pelo *T. gondii* através da camada de células mesoteliais

e, em seguida, a camada de células de músculo liso, o tecido conjuntivo e a camada de células epiteliais, onde alguns atingem a luz intestinal. De acordo com ZENNER et al. (1998), na infecção intraperitoneal com a cepa RH os taquizoítas infectam os órgãos adjacentes à cavidade peritoneal e depois infectam a corrente sanguínea, pela qual os taquizoítas se disseminam por todo o organismo. FERRO et al. (1999) estudando a toxoplasmose congênita de *C. callosus* consideram a possibilidade da rota vascular para as células trofoblásticas que estão parasitadas.

Ainda, no íleo observa-se a destruição de vários tipos celulares em diferentes regiões, o que coincide com o descrito por DUBEY et al. (1997) que notaram em camundongos infectados, por  $1-7,5 \times 10^7$  oocistos de *T. gondii* da cepa VEG, a presença de lesões microscópicas no intestino, predominantemente, necrose de células da lámina própria, causando a destruição das células epiteliais simples, extrusão de conteúdo de células da lámina própria na luz intestinal, edema e necrose de vasos sanguíneos. Após 48 horas de infecção a maioria das células da lámina própria estão lisadas e alguns taquizoítas intracelulares são encontrados em diferentes estágios de divisão endodiogênica (DUBEY et al., 1997).

Algumas células que compõe o epitélio intestinal foram extremamente alteradas, as células absorтивas e as células caliciformes foram encontradas, inclusive, em diferentes estágios de degeneração sugerindo, o processo de apoptose para estas células. Já que estas possuem morfologia típica: não há rompimento da célula e sim um processo de retração, condensação citoplasmática e nuclear, com fragmentação nuclear em grumos (GERCHENSON et al., 1992; SQUIER et al., 1995). O processo de apoptose pode estar ocorrendo em resposta à fase aguda do toxoplasmose.

Os mastócitos encontrados na submucosa do íleo apresentam alterações morfológicas e contêm no seu interior *T. gondii* com morfologia alterada e exibindo pequenos processos de vacuolização no seu citoplasma. HUNTLEY et al. (1985) sugerem que a perturbação das células epiteliais durante a penetração de esporozoítos de *Eimeria* envolve a descarga de constituintes dos grânulos dos mastócitos de mucosa, especificamente, através de desgranuladores de mastócitos produzidos pelos esporozoítos, ou indiretamente através de produtos derivados de outras células ativadas ou destruídas da mucosa. Infecções por *Eimeria*

desencadeiam um substancial aumento no número de mastócitos intestinais com conseqüente liberação de RMCP II. Esta protease causa a permeabilidade da mucosa permitindo a translocação dentro do lúmen de fatores do sistema imune (HUNTLEY et al., 1985).

A habilidade do *T. gondii* em infectar todo tipo de células de mamíferos nucleadas, ainda não é totalmente conhecida em relação às proteínas ou receptores das células hospedeiras que participam desta ligação (CARRUTHERS et al., 2000). Estes autores sugerem que proteoglicanas sulfatadas, GAGs, participem desta ligação e conseqüentemente auxiliem a invasão de células hospedeiras pelo *T. gondii*. GAGs estão presentes na superfície de quase todas as células de mamíferos, inclusive em mastócitos, nos quais desempenham um importante papel de apresentação de IFN- $\gamma$ , citocina fundamental para a ativação de macrófagos (BROOKS et al., 2000). No presente trabalho foram encontradas, tanto no exudato peritoneal como em tecidos, células com morfologia de macrófagos, muitas vezes exibindo interação com mastócitos. Tal interação pode estar relacionada com a ativação de macrófagos, células importantes na resistência à infecção aguda, ressaltando o papel imunorregulador dos mastócitos na toxoplasmose. Além disso, foram observados macrófagos com taquizoítas no seu interior. Assim, essa facilidade em invadir e, conseqüentemente, parasitar células hospedeiras explica porque os órgãos estudados, figado, íleo e linfonodos, no presente trabalho, possuem tantos tipos celulares parasitados e muitas vezes destruídos.

No presente estudo, os mastócitos dos linfonodos presentes na cápsula, seios linfáticos e tecido linfóide *C. callosus* apresentam características morfológicas semelhantes entre si. Diferindo do descrito para os mastócitos dos seios linfáticos observados em alguns linfonodos do gambá *D. albiventris* (CHIARINI-GARCIA & MACHADO, 1992; SANTOS, 1996; FERREIRA, 1997; CHIARINI-GARCIA et al., 2000). A presença de taquizoítas em todas as regiões do linfonodo dorsal de *C. callosus*, semelhante ao encontrado no figado e no íleo, além de vários tipos celulares parasitados coincide com os achados de DUBEY et al. (1997) que estudando camundongos infectados pela cepa VEG de *T. gondii* observaram que, após 48 horas de infecção, há grande quantidade de parasitas no linfonodo

mesentérico e que a maioria encontra-se nos seios corticais e nos folículos linfóides. Porém estes autores não fazem referência aos mastócitos, pois este não foi objeto de seus estudos. Nos linfonodos estudados, no presente trabalho, observou-se a ocorrência de mastócitos em interação com o parasita e com células parasitadas apresentando alterações morfológicas acentuadas, contudo, em toda a literatura consultada não há relato da ocorrência de interação entre mastócitos e *T. gondii*, embora a participação dos mastócitos na resposta imune contra parasitas tem sido, extensivamente, estudada (KELLER et al., 1974; RUITEMBERG & ELGERMA, 1976; HUNTLEY et al., 1985; LOZZI et al., 1996; HARDIN, 1997; ONAH et al., 2000; RICHARD et al., 2000). Mastócitos contribuem para a proteção do hospedeiro utilizando mecanismos contra infecções parasíticas. Após ativação IgE-Ag os mastócitos podem produzir múltiplas citocinas que podem amplificar o processo inflamatório enquanto que um painel similar de citocinas, relacionadas com o perfil de resposta imunológica Th2, pode suportar estratégias imunológicas contra parasitas (HULTNER et al., 2000). Em mastócitos de gerbis da Mongólia estimulados pelo composto 48/80, as alterações morfológicas restringem-se à vacuolização das células com grau variado de dissolução da matriz dos grânulos dentro dos vacúolos, mesmo em grau máximo de estimulação com 75% da histamina liberada (BLOOM et al., 1978). Estudos sobre mastócitos do epitélio nasal (KAWABORI et al., 1983) respondem à estimulação, do composto 48/80, apresentando grau variado de vacuolização e alteração dos grânulos. Os mastócitos peritoneais de ratos (ROLICH, 1975) e mastócitos isolados de pulmão humano (CAULFIELD et al., 1980), sob estimulação, apresentam interação entre a membrana celular e a perigranular, provavelmente, com a participação de microfilamentos (CAULFIELD et al., 1980; ROLICH, 1975).

Após 12 horas de infecção da cavidade peritoneal, observa-se aumento na quantidade de mastócitos presentes no exudato peritoneal de *C. callosus*. Aumento no número de mastócitos foi descrito também por LOZZI et al. (1996) que analisaram camundongos após infecção por cercárias de *Schistosoma mansoni* e observaram que o número de mastócitos aumenta até o 4º dia após a estimulação e diminui para valores normais apenas no 8º dia. Consideraram que estas alterações

podem ter ocorrido após estimulação antigênica em resposta a um processo de drenagem no sítio de estimulação das cercárias. Segundo PARMENTIER et al. (1987) mastócitos de mucosa respondem à infecção por *Trichinella spiralis* e esta resposta deve-se, provavelmente, à proliferação local e maturação de precursores de mastócitos. Esta resposta pode ser amplificada pelo influxo de células precursoras na corrente sanguínea do intestino. KELLER et al. (1974) relataram que o número de mastócitos e sua distribuição em linfonodo mesentérico de ratos foi estudado após infecção pelo nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis*. A infecção por *N. brasiliensis* revela dois picos na contagem total do número de mastócitos; sendo assim KELLER et al. (1974) sugerem que a redistribuição de mastócitos envolve imigração e proliferação local. RUITEMBERG & ELGERMA (1976) contaram mastócitos do jejuno de camundongos B10LP infectados com 100 larvas de *Trichinella spiralis*, e notaram que o número de mastócitos, encontrados no dia zero, diminui após três dias de infecção e que no 7º dia ocorre um acentuado aumento no número de mastócitos, seguido de um gradual declínio até o 16º dia. A diminuição inicial é atribuída a metabólitos tóxicos do parasita e o subsequente aumento da proliferação de células precursoras.

Os mastócitos, após purificação, não apresentam alterações coincidindo com o descrito por ENERBACK & SVENSSON (1980) que estudaram a purificação de mastócitos peritoneais de ratos e constataram que após a centrifugação dos mastócitos, células de alta densidade, utilizando Percoll, sua morfologia, composição química e a capacidade secretória permanecem preservadas.

Os mastócitos do exudato peritoneal de *C. callosus*, aparentemente, interagem com *T. gondii* *in vitro* após 30 e 60 minutos e as duas células apresentaram alterações morfológicas. Dados sobre a interação entre mastócitos e *T. gondii* são raros, todavia HENDERSON & CHI (1998) descreveram esta interação *in vitro* entre mastócitos e *T. gondii* e após uma hora de incubação os mastócitos apresentam grandes canais intracitoplasmáticos secretórios, grânulos com conteúdo pouco elétron-densos e extrusão de conteúdo de grânulos; os parasitas após uma hora de incubação exibem rompimento de membrana, vacuolização do seu citoplasma e destruição de organelas.

A análise da incubação entre mastócitos e *T. gondii* *in vitro* à microscopia eletrônica de transmissão confirma os resultados encontrados no microscópio confocal. O momento zero evidencia que não há contato entre as células e que após 30 e 60 minutos de incubação observa-se contato entre mastócitos e *T. gondii* e o anticorpo monoclonal E9 liga-se a proteína de superfície P30 marcando apenas sua membrana.

Nossos dados permitem sugerir que os mastócitos têm importância na defesa contra *T. gondii*, através de mediadores químicos, produzidos por eles que induzem a citotoxicidade do parasita ou pelas suas diferentes populações celulares que podem expressar significantes variações no número, fenótipo e/ou função, particularmente, durante o curso de uma resposta inflamatória ou imune (HENDERSON & CHI, 1998; GALLI et al., 1999).

## *Conclusões*

## 8-Conclusões

- 8.1- Após 12 horas de infecção por *Toxoplasma gondii* há aumento na quantidade de mastócitos no exudato peritoneal de *Calomys callosus*, o que sugere ocorrer diferenciação ou migração de precursores de mastócitos para a cavidade peritoneal.
- 8.2- Ultra-estruturalmente os mastócitos peritoneais e os mastócitos da derme da orelha e dos linfonodos submandibular e dorsal de *C. callosus* apresentam-se, morfologicamente, semelhantes entre si exibindo inúmeros grânulos citoplasmáticos com conteúdo, em sua maioria, elétron-denso e homogêneo.
- 8.3- Após 48 horas de infecção por *T. gondii* os mastócitos dos vários órgãos (orelha, íleo e linfonodos submandibular e dorsal) de *C. callosus* apresentam, ultra-estruturalmente, alterações morfológicas acentuadas: grânulos citoplasmáticos com conteúdo pouco elétron-denso, presença de canais intracitoplasmáticos com sinais indicativos de desgranulação, rompimento de membrana plasmática e conteúdo de grânulos no meio extracelular, indicando que os mastócitos participam da resposta imune contra a infecção por *T. gondii*. Além disso, os mastócitos interagem com outros tipos celulares, como macrófagos, ressaltando o seu papel imunorregulador na infecção aguda.
- 8.4- Os órgãos de *C. callosus* que foram analisados ultra-estruturalmente: fígado, íleo e linfonodos submandibular e dorsal, exceto a orelha, estão parasitados após 48 horas de infecção por *Toxoplasma gondii*.

8.5- As alterações morfológicas, à microscopia de luz e à microscopia eletrônica de transmissão, apresentadas pelos mastócitos do exudato peritoneal de *C. callosus* após 12 horas de infecção evidenciam a participação dos mastócitos na resposta imunológica à infecção por *T. gondii*.

8.6- Os taquizoítas de *T. gondii* após 12 horas de infecção invadem mastócitos e outros tipos celulares presentes no exudato peritoneal. Neste momento o parasita é encontrado, quase que exclusivamente, intracelular.

8.7- Os mastócitos colhidos do exudato peritoneal de *C. callosus* interagem com os parasitas *in vitro* e apresentam alterações morfológicas indicativas de processo de desgranulação. Provavelmente, em consequência desta interação.

8.8- Pela primeira vez descreve-se o comportamento *in vivo* dos mastócitos frente à infecção pelo *T. gondii*.

8.9- Pela primeira vez descreve-se a morfologia de mastócitos de *C. callosus* controle e após infecção por *T. gondii*.

# *Referências Bibliográficas*

## .9-Referências Bibliográficas

- ASKENASE, P. W.; BURSZTAJN, S.; GERSHON, M. D.; GERSHON, R. K. T cell-dependent mast cell degranulation and release of serotonin in murine delayed-type hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, v. 152, p. 1358-1374, 1980.
- AUSTEN, K. F. The heterogeneity of mast cell populations and products. *Hosp. Practice*, v. 19, n. 9, p. 135-146, 1984.
- AZZALI, G. & DIDIO, L. J. A. The lymphatic system of *Didelphys azarae* and *Didelphys marsupialis*. *Am. J. Anat.*, v. 116, p. 449-470, 1965.
- BANCROFT, G. J.; SCHEREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the SCID mouse. *Immunol.*, v. 124, p. 5-8, 1991.
- BANCROFT, G. J.; SHEEHAN, K. C.; SCHEREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. Tumor necrosis factor is involved in the T cell-independent pathway of macrophage activation in SCID mice. *J. Immunol.*, v. 143, p. 127-130, 1989.
- BEFUS, D.; LEE, T.; GOTO, T.; GOODACRE, R.; SHANAHAN, F.; BIENENSTOCK, J. Histologic and functional properties of mast cells in rats and humans. In: BEFUS, A. D.; BIENENSTOCK, J.; DENBURG, J. A., **Mast cell differentiation and heterogeneity**. New York: Raven Press, p. 205-213, 1986.
- BEHRENDT, H.; GOERTZ, W.; STANG-VOSS, C. Ultrastructural differences in isolated mast cell from various species. *Agents Actions*, v. 8, n. 4, p. 382-383, 1978.
- BIENENSTOCK, J.; BEFUS, D.; PEARCE, F.; DENBURG, J.; GOODACRE, R. Mast cell heterogeneity, derivation and function with emphasis on the intestine. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 70, n. 6, p. 407-412, 1982.

- BIENENSTOCK, J.; TOMIOKA, M.; STEAD, R.; ERNST, P.; JORDANA, N., GAULDIE, J.; DOLOVICH, J.; DENBURG, J. Mast cell involvement in various inflammatory processes. **Amer. Rev. Resp. Dis.**, v. 135, n. 6, p. S5-S8, 1987.
- BLOOM, G. D.; HELANDER, H. F.; KRÜGER, P. G. Mast cells of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Medical Biology**, v. 56, p. 201, 1978.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction the bradizoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide triggering stage conversion. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1761-1767, 1994.
- BONHOMME, A.; PINGRET, L.; PINON, J. M. Review: *Toxoplasma gondii* cellular invasion. **Parasitology**, v. 34, n. 1-3, p. 31-43, 1992.
- BROOKS, B.; BRIGGS, D. M.; EASTMOND, N. C.; FERNIG, D. G.; COLEMAN, J. W. Presentation of IFN- $\gamma$  to nitric oxide-producing cells: a novel function for mast cells. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 573-579, 2000.
- BUCKLEY, S. M. Survival of *Toxoplasma gondii* in mosquito cell lines and establishment of continuous infection in Vero cell cultures. **Exper. Parasitol.**, v. 33, p. 23-26, 1973.
- CALDÉRON, G. M.; TORRES-LOPES, J.; LIN, T. J.; CHAVEZ, B.; HERNANDEZ, M.; MUÑOZ, O.; BEFUZ, A. D.; ENCISO, J. A. Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2755-2761, 1998.
- CARRUTHERS, V. B.; HAKANSSON, S.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4005-4011, 2000.
- CAULFIELD, J. P.; LEWIS, R. A.; HEIN, A.; AUSTEN, K. F. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. **J. Cell. Biol.**, v. 85, p. 299-311, 1980.

- CHIARINI-GARCIA, H. & MACHADO, C. R. S. Mast cell types and their distribution in the lymph nodes of opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae). *Cell Tissue Res.*, v. 268, p. 571-574, 1992.
- CHIARINI-GARCIA, H.; SANTOS, A. A. D.; MACHADO, C. R. S. Morphological changes induced by the compound 48/80 in mast cells of the opossum *Didelphis albiventris*. *Acta Microscopica*, v. 6, p. 749-750, 1997.
- CHIARINI-GARCIA, H.; SANTOS, A. A. D.; MACHADO, C. R. S. Mast cells types and cell-to-cell interactions in lymph node of the opossum *Didelphis albiventris*. *Anat. Embriol.*, v. 201, p. 197-206, 2000.
- CHIU, H. & LAGUNOFF, D. Histochemical comparison of vertebrate mast cells. *Histochemical Journal*, v.4, p. 135-144, 1972.
- CHURCH, M. L. K.; PAO, J. K.; HOLGATE, S. T. Characterization of histamine secretion from mechanically dispersed human lung mast cells; effects of anti-IgE, calcium ionophore A-23187, compound 48/80 and basic polypeptides. *J. Immunol.*, v. 129, n. 5, p. 2116-2121, 1982.
- CHURCH, M. K.; EL-LATI, S.; CAULFIELD, J. P. Neuropeptide-induced secretion from human skin mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v. 94, p. 310-318, 1991.
- DARCY, F.; DESLEE, D.; SANTORO, F.; CHARIF, H.; AURIANT, C.; DECOSTER, A.; DUQUESNE, V.; CAPRON, A. Induction of a protective antibody dependent response against toxoplasmosis by "in vitro" excreted/ secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Immunol.*, v. 10, p. 553-567, 1988.
- DIMITRIADOU, V.; LAMBRACHT-HALL, M.; REICHLER, J.; THEOHARIDES, T. C. Histochemical and ultrastructural characteristics of rat brain perivascular mast cells stimulated with compound 48/80 and carbachol. *Neuroscience*, v. 39, p. 209-224, 1990.

- DUBEY, J. P.; SHEN, S. K.; KNOK, O. C. H.; THULLIEZ, P. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvergicus*); congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. **Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 9-14, 1997.
- DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; BLIXT, J. A. Oocist induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 5, p. 870-882, 1997.
- EHRLICH, P. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung [PhD Thesis]. Leipzig: University of Leipzig (Title translation: Supplements to the theory and practices of histological staining), 1898.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa; I- effects of fixations. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 66, p. 289-302, 1966a.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa; II- dye bindings and metachromatic properties. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 66, p. 303-12, 1966b.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa; III- reactivity towards compound 48/80. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 66, p. 313-22, 1966c.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa; IV- monoamine storing capacity. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 67, p. 367-379, 1966d.
- ENERBACK, L. & LÖWHAGEN, G. B. Long term increase of mucosal mast cells in the rat induced by administration of compound 48/80. **Cell. Tissue Res.**, v. 214, p. 239-246, 1979.
- ENERBACK, L. & SVENSSON, I. Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of Percoll. **Journal of Immunological Methods**, v. 39, p. 135-145, 1980.

- ENERBACK, L. Mucosal mast cells in the rat and in man. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 82, n. 3-4, p. 249-55, 1986.
- ENNER, L.; DARCY, F.; CESBRON-DELAUW, M. F.; CAPRON, A. Rat model of congenital toxoplasmosis: Rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 1, p. 360-363, 1993.
- ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**, 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole LTDA, p. 2557, 1992.
- FADUL, C. E.; CHANNON, J. Y.; KASPER, L. H. Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in non-adherent human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4290-4294, 1995.
- FAVORETO Jr, S.; FERRO, E. A. V.; SILVA, M.; CLEMENTE, D.; RODRIGUES, J. R. Estudo da susceptibilidade de *Calomys callosus* a infecção experimental por *Toxoplasma gondii*. I SEMANA DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. Anais, 1994.
- FAVORETO Jr., S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 103-107, 1998.
- 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 Med. and Parasitol.**, v. 75, n. 5, p. 539-546, 1981.
- FERRARI, J. A. & MACHADO, C. R. S. Demonstração histoquímica de histamina em mastócitos de mesentério do gambá *Didelphis albiventris*. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR E VII COLÓQUIO BRASILEIRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, Rio de Janeiro, 1980. Resumos., Rio de Janeiro, 1980. p. 182-183.

- FERREIRA, G. L. S. & SANTOS, A. A. D. Estudos ultra-estruturais dos mastócitos do linfonodo da cauda do pâncreas do gambá *Didelphis albiventris*. In: XIV SEMANA CIENTÍFICA DE ESTUDOS BIOLÓGICOS, Uberlândia, 1997. Resumos, Uberlândia, 1997, p. 23.
- FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO, S. J.; SILVA, D. A. O.; MORTARA, R. A.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. *Parasitol. Res.*, v. 85, p. 647-654, 1999.
- FORTES, E. *Parasitologia veterinária*. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ícone, p. 70, 1997.
- FOX, C. C.; DVORAK, A. M.; PETERS, S. P.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L. M. Isolation and characterization of human intestinal mucosal mast cells. *J. Immunol.*, v. 135, n. 1, p. 483-491, 1985.
- FRIEDMAN, M. M. & KALINER, M. Ultrastructural changes in human skin mast cells during antigen-induced degranulation *in vivo*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 82, p. 998-1005, 1988.
- FRIEND, D. S.; GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F.; HUNT, J.; STEVENS, R. L. Senescent jejunal mast cells and eosinophils in the mouse preferentially translocated to the spleen and draining lymph node, respectively, during the recovery phase of helminth infection. *J. Immunol.*, v. 165, n. 1, p. 344-352, 2000.
- FURTADO, G.; CAO, Y.; JOINER, K. A. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding the  $\beta_1$  integrin receptor  $\alpha_6\beta_1$  on human foreskin fibroblast and chinese hamster ovary cells. *Infect. Immunol.*, v. 60, p. 4925-4931, 1992.
- GALLI, S. J. Mast cell heterogeneity; can variation in mast cell phenotype be explained without postulating the existence of distinct mast cell lineage? In: BEFUS, A. D.; BIENESTOCK, J.; DENBURG, J. A. Mast cell differentiation and heterogeneity. New York, Raven Press, p. 167-181, 1986.

GALLI, S. J. New approaches for the analysis of mast cell maturation, heterogeneity and function. **Fed. Proc.**, v. 46, n. 5, p. 1906-1914, 1987.

GALLI, S. J. New insights into "The riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Laboratory Investigation**, v. 62, n. 1, p. 5-33, 1990.

GALLI, S. J. New concepts about the mast cell. **New Engl. J. Med.**, v. 328, n. 4, p. 257-265, 1993.

GALLI, S. J.; MAURER, M.; LANTZ, C. S. Mast cells as sentinels of innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, p. 53-59, 1999.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunol.**, v. 146, p. 286-292, 1991.

GAZZINELLI, R. T.; ELTOUM, I.; WYNN, T. A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF- $\alpha$  and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **The Journal of Immunol.**, v. 151, n. 7, p. 3672-3681, 1993a.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WOLF, S.; SHER, A. IL-12 is required for the T-cell independent induction of IFN- $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-deficient hosts. **Proceedings Nat. Acad. Science USA**, v. 90, p. 6115-6119, 1993b.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- $\gamma$  synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, p. 2533-2543, 1994b.

GERSCHENSON, L. E. & ROTELLO, R. J. Apoptosis: a different type of cell death. **FASEB J.**, v. 6, p. 2450-2455, 1992.

GINSBURG, H.; OLSON, E. C.; HUFF, T. F.; OKUDAIRA, H.; ISHIZAKA, T. Enhancement of mast cell differentiation *in vitro* by T cell factor(s). **Int. Archs. Allergy Appl. Immun.**, v. 66, p. 447-458, 1981.

GLEICH, G. J.; ACKERMAN, S. J.; HISAMATSU, I. & LEIFERMAN, K. M. Mast cell heterogeneity; biological and clinical significance. In: BEFUS, A. D., BIENENSTOCK, J. & DENBURG, J. A. Mast cells differentiation and heterogeneity. New York: Raven Press, p. 347-366, 1986.

GRAU, G. E.; TACCHINI-COTTIER, F.; PIQUET, P. F. Is TNF beneficial or deleterious in toxoplasmic encephalitis? **Paras. Today**, v. 8, n. 10, p. 322-324, 1992.

HARDIN, J. A.; BURET, A. G.; OLSON, M. E.; KIMM, M. H.; GALL, D. G. Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in animal model of giardiasis. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 5, p. 908-912, 1997.

HERDERSON Jr., W. R. & CHI, E. Y. The importance of leukotrienes in mast cell-mediated *Toxoplasma gondii* citotoxicity. **The Journal of Infection Disease**, v. 177, p. 1437-1443, 1998.

HOWE, D. K. & SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. **Exp. Parasitol.**, v. 78, p. 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 Infection Disease**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

- HULTNER, L.; KOLSCH, S.; STASSEN, M.; KASPERS, U.; KREMER, J. P.; MAILHAMMER, R.; MOELLER, J.; BROSZEIT, H.; SCHMITT, E. In activated mast cells IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J. Immunol.*, v. 164, n. 11, p. 5556-5563, 2000.
- 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*, v. 84, p. 16-20, 1995.
- HUNTLEY, J. F.; NEWLANDS, G. F. J.; MILLER, H. R. P.; McLAUCHLAN, M.; ROSSI, M. E.; HESKET, P. Sistemic release of mucosal mast cell protease during infection with the intestinal protozoal parasite, *Eimeria nieschulzi*. Studies in normal and the nude rats. *Parasite Immunology*, v. 7; p. 489-501, 1985.
- JOINER, K. A. & DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infection and Immunity*, v. 61, n. 4, p. 1169-1172, 1993.
- JUSTINES, G. & JOHNSON, K. M. Imune tolerance in *Calomys callosus* infected with machupo virus. *Nature*, v. 22, p. 1090-1091, 1969.
- JUSTINES, G. & JOHNSON, K. M. Observations on the laboratory breeding of the cricetidae rodent *Calomys callosus*. *Lab. Anim. Core.*, v. 20, p. 57-60, 1970.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldeido fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v. 27, p. 137A-138A, 1965.
- KASPER, L. H. Identification of stage specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, v. 57, p. 668-672, 1989.
- KASPER, L. H. & BOOTHROYD, J. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In WARREN, K. S.: *Immunol. Mol. Biol. of Parasitic Infections*, 3<sup>a</sup> ed., Boston: Blackwell Scientific Publications, p. 269-301, 1993.

- KAWABORI, S.; OKUDA, M.; UNNO, T. Mast cells in allergic nasal epithelium and lamina propria before and after prococation. **Clin. Allergy**, v. 13, p. 181, 1983.
- KAZIMIERCZACK, W.; PATKAR, S. A.; DIAMANT, B. The mechanism of histamine release induced by ionophore X537A from isolated rat mast cells. **Acta Phisiol. Scand.**, v. 102, p. 265-273, 1978.
- KELLER, R.; COTTIER, H.; HESS, M. W. Mast cell responses in mesenteric lymph node to infection of rats with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunology**, v. 27, p. 1039-1044, 1974.
- KIMATA, I. & TANABE, K. Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. **Journal of Cell Science**, v. 88, p. 231-239, 1987.
- KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y.; FUJITA, J.; NAKANO, T. Differentiation and transdifferentiation of mast cells, a unique member of the hemopoietic cell family. **Internacional Journal of Cell Cloning**, v. 3, n. 2, p. 108-121, 1987a.
- KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y.; SONODA, S.; ASAI, H.; NAKANO, T. Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 82, n. 3-4, p. 244-248, 1987b.
- KITAMURA, Y. & FUJITA, J. Regulation of mast cell differentiation. **BioEssays**, v. 10, p. 193-195, 1989.
- KITTAS, C. & HENRY, L. Effect of sex hormones on the response of mice to infection with *Toxoplasma gondii*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 61, p. 590-600, 1980.
- KOPS, S. K.; THEOHARIDES, T. C.; CRONIN, C. T.; KASHGARIAN, M. G.; ASKENASE, P. W. Mast cell activation and vascular alterations in immediate-hypersensitivity-like reactions induced by T-cell derived antigen-binding factor. **Lab. Invest.**, v. 50, p. 421-434, 1984.

- KOPS, S. K.; THEOHARIDES, T. C.; CRONIN, C. T.; KASHGARIAN, M. G.; ASKENASE, P. W. Ultrastructural characteristics of rat peritoneal mast cells undergoing differential release of serotonin without histamine and without degranulation. **Cell. Tissue Res.**, v. 262, p. 415-424, 1990.
- KRÜGER, P. G. Morphology of normal and secreting mast cells. **Acta. Otolaryngol. Suppl.**, v. 414, p. 23, 1984.
- LAGUNOFF, D.; & MARTIN, T. W. Agents that release histamine from mast cells. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 23, p. 331-351, 1983.
- LEE, T. D. G.; SWIETER, M.; BEFUS, A. D. Mast cell responses to helminthy infection. **Parasitology Today**, v. 2, n. 7, p. 186-191, 1986.
- LERICHE, M. A. & DUBREMETZ, J. F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacule after host-cell invasion. **Parasit. Res.**, v. 76, p. 559-562, 1990.
- LEWIS, R. A. & AUSTEN, K. F. Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. **Nature**, v. 293, p. 130-108, 1981.
- LOZZI, S. P.; MACHADO, C. R. S.; GERKEN, S. E.; SANTOS, T. A. M. Involvement of regional lymph node after penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae in naive and infected mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 91, n. 4, p. 491-498, 1996.
- LUNDE, M. N. & JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitol.**, v. 69, n. 5, p. 806-808, 1983.
- MACEDO, M. S. Hipersensibilidade imediata. In: CALICH, V. L. & VAZ, C. A. C., **Imunologia Básica**. Brasil, Artes Médicas, p. 245-274, 1989.

- MACHADO, C. R. S. Presença de serotonina em mastócitos de 3 espécies de marsupiais brasileiros. In: II Congresso Brasileiro de Biologia Celular e VII Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro, 1980. Resumos., Rio de Janeiro, 1980. p. 172-173.
- MAJEEED, S. K. Mast cell distribution in rats. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, v. 44, n. 3, p. 370-374, 1994.
- MARSHALL, J. S.; STEAD, R. H.; McSHARRY, C.; NIELSEN, L.; BIENENSTOCK, J. The role of mast cell degranulation products in mast cell hyperplasia. *J. Immunol.* v. 144, p. 1886-1892, 1990.
- MARSHALL, J. S. & BIENENSTOCK, J. The role of mast cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. *Current Opinion Immunol.*, v. 6, p. 853-859, 1994.
- MARUYAMA, H.; OSADA, Y.; YOSHIDA, A.; FUTAKUCHI, M.; KAWAGUCHI, H.; ZHANG, R.; FU, J.; SHIRAI, T.; KOJIM, S.; OHTA, N. Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol.*, v. 22, n. 6, p. 279-286, 2000.
- 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 Disease*, v. 149, n. 2, p. 234-244, 1984.
- MELLO, D. A. Studies on reproduction and longevity of *Calomys callosus* (Renger, 1830) under laboratory conditions (Rodentia, Cricetidae), *Rev. Bras. Biol.*, v. 41, n. 4, p. 841-843, 1981.
- METCHNIKOFF, E. Lecons sur la Pathologie comparée de L'Inflammation. Paris: Masson, 1892. [Title translation: Lessons on the comparative pathology of inflammation].
- MILLER, H. R. P. The structure, origins and function of mucosal mast cells. *Biol. Cell.*, v. 39, p. 229-232, 1980.

- MINEO, J. R. & KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein SAG-1 (P 30). **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 1, p. 11-20, 1994.
- MIO, M. & TASAKA, K. Microfilament-associated, local degranulation of rat peritoneal mast cells. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 88, p. 369-371, 1989.
- MOSMANN, T. R.; BOND, M. W.; COFFMAN, R. L.; OHARA, J.; PAUL, W. E. T. Cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 15, p. 5654-5659, 1986.
- MOTA, I. & VUGMAN, I. Action of compound 48/80 on the mast cells and histamine content of guinea-pig tissues. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 11, p. 304-307, 1956a.
- MOTA, I. & VUGMAN, I. Effects of anaphylatic schock and compound 48/80 on the mast cells guinea-pig lung. **Nature**, v. 177, p. 427-429, 1956b.
- MOTA, I. The mast cell revisited. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 28, p. 895-901, 1995.
- NABELL, G.; GALLI, S. J.; DVORACK, H. F.; CANTOR, H. Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells. **Nature**, v. 291, p. 332-334, 1981.
- NAWA, Y.; HORII, Y.; OKADA, M.; ARIZONO, N. Histochemical and cytological characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 104, p. 249-254, 1994.
- NICHOLS, B. A. & CHIAPPINO, M. N. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. **J. Protozool.**, v. 34, n. 2, p. 217-226, 1987.
- NICOLLE, C. & MANCEUX, L. Sur une infection a corps Leishman (ou organismes voifins) di gondi. **C. R. Acad. Sci.**, v. 147, p. 763-766, 1908.

- NIELSEN, E. H. & JAHN, H. Cytoskeletal studies on Lowicryl K4M embedded and Affigel 731 attached rat peritoneal mast cells. *Virchows Arch. B. Zellpath.*, v. 45, p. 313-323, 1984.
- OLIVEIRA, S. H. P.; FACCIOLO, L. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Role of resident peritoneal cells in eosinophils migration induced by saline. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 104, p. 323-331, 1994.
- ONAH, D. N.; UCHIYAMA, F.; NAGAKUI, Y.; ONO, M.; TAKAI, T.; NAWA, Y. Mucosal defense against gastrointestinal nematodes: responses of mucosal mast cells and mouse mast cell protease I during primary *Strongyloides venezuelensis* infection in FcR $\gamma$ -Knockout mice. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 9, p. 4968-4971, 2000.
- PARMENTIER, H. K.; TEPPEMA, J. S.; LOVEREN, H. van; TAS, J.; RUITEMBERG, E. J. Effect of a *Trichinella spiralis* infection of the distribution of mast cells precursors in tissues of thymus-bearing and non-thymus-bearing (nude) mice determined by and *in vitro* assay. *Immunology*, v. 60, p. 565-571, 1987.
- PEARCE, F. L. Funcional heterogeneity of mast cells from different species and tissues. *Klin. Wochenschr.*, v. 60, p. 954-957, 1982.
- PEARCE, F. L.; ALI, H.; BARRET, K. E.; BEFUS, A. D.; BIENENSTOCK, J.; BROSTOFF, J.; ENNIS, M.; FLINT, K. C.; HUDSPITH, B.; JOHNSON, N. M.; LEUNG, K. B. P.; PEACHELL, P. T. Functional characteristics of mucosal and connective tissue mast cells of man the rat and other animals. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v. 77, p. 274-276, 1985.
- PEARCE, F. L. On the heterogeneity of mast cells. *Farmacology*, v. 32, p. 61-71, 1986.
- PETTER, F.; KARIMI, Y.; ALMEIDA, C. R. Un nouveau ranger de laboratoire, le cricétidé (Rodentia, Cricetidae). *C. R. Acad. Paris*, v. 265, p. 1974-1976, 1967.
- PFEFFERKORN, E. R. Cell Biology of *Toxoplasma gondii*. *Trends in Cell Biol.*, v. 5, n. 3, p. 129-132, 1990.

- PFEFFERKORN, E. R.; ECKEL, M.; REBHUN, S. Interferon-gama supresses the growth of *Toxoplasma gondii* in humam fibroblasts through starvation for tryptophan. **Molec. Biochem. Parasitol.**, v. 20, p. 215-222, 1986.
- POLAT, C. Circadian variation in the structure of mast cells. **Acta Anat.** v. 108, p. 443-445, 1980.
- RIBEIRO, R. D. Novo reservatório do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Biol.**, v. 33, p. 429-437, 1973.
- RICHARD, M.; GRENCIS, R. K.; HUMPHREYS, N. E.; RENAUD, J. C.; SNICK, J. V. Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. **Proc. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 2, p. 776-772, 2000.
- RODRIGUES, D. Estudo ultra-estrutural do citoesqueleto de mastócitos isolados da cavidade peritoneal do *Calomys callosus*. Uberlândia, 1999. 28p. Monografia (Curso de Ciências Biológicas), Universidade Federal de Uberlândia, 1999.
- RÖHLICH, P.; ANDERSON, P.; UVNAS, B. Electron microscope observations on compound 48/80-induced degranulation in rat mast cells. **J. Cell. Biol.**, v. 51, p. 465-483, 1971.
- RÖHLICH, P. Membrane-associated actin filaments in the cortical cytoplasm of the rat mast cell. **Experim. Cell. Res.**, v. 93, p. 293-298, 1975.
- RUITEMBERG, E. J. & ELGERSMA, A. Absence of intestinal mast cell response in congenitally athimic mice during *Trichinella spiralis* infection. **Nature**, v. 264, p. 258-260, 1976.
- RUSSEL, D. G. & SINDEN, R. E. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. **J. Cell Sci.**, v. 50, p. 345-359, 1981.

SANTOS, A. A. D. & MACHADO, C. R. S. Histochemical and ultrastructural studies of mast cells in the intestinal mucosa and skin of the opossum *Didelphis albiventris*. **Histochemical Journal**, v. 26, p. 233-238, 1994.

SANTOS, A. A. D. **Mastócitos da orelha, do íleo e de linfonodos abdominais do gambá *Didelphis albiventris* (Didelphidea, Marsupialia)**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1996. 172 p. Dissertação (Doutorado em Morfologia) – Curso de Pós-graduação da Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

SANTOS, A. A. D. **Ocorrência de diferentes populações de mastócitos na orelha e no íleo do gambá *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Didelphidea, Marsupialia). Estudos Histológicos, Histoquímicos e Ultra-estruturais**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1988. 120 p. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Curso de Pós-graduação da Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

SANTOS, A. A. D.; CHIARINI-GARCIA, H.; MACHADO, C. R. S. Effect of compound 48/80 on the dermal and intestinal mast cells of the opossum *Didelphis albiventris*. **Acta Microscopica**, v. 6, p. 785-786, 1997a.

SANTOS, A. A. D.; CHIARINI-GARCIA, H.; MACHADO, C. R. S. Mast cells of the mesenteric lymph node of the opossum *Didelphis albiventris*. **Acta Microscopica**, v. 6, p. 787-788, 1997b.

SHANAHAN, F.; DENBURG, J. A.; BIENENSTOCK, J.; BEFUS, A. D. Mast cell heterogeneity. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 62, p. 734-737, 1984.

SMITH, G. A. & RENNICK, D. M. Characterization of a murine lymphokine distinct from interleukin 2 (IL-2) and interleukin 3 (IL-3) possesing a T cell growth factor activity and a mast cell growth factor activity that synergizes with IL-3. **Immunology**, v. 83, p. 1857-1861, 1986.

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*. **Exp. Parasitol.**, v. 78, p. 361-370, 1994.

SOTER, N. A. Mast cells in cutaneous inflammatory disorders. *J. Investigative Dermatology*, v. 80, p. S22-S5, 1983.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli. Incontrato nelle lesioni Anatomiche d'una malattia che Ricorda in molti punti il Kala dell'uomo. *Ver. Soc. Sci. (São Paulo)*, v. 3, p. 109-112, 1908. *Biol.*, v. 79, p. 237-248, 1973.

SQUIER, M. K. T.; SEHNERT, A. J.; COHEN, J. J. Apoptosis in Leukocytes. *J. Leuk. Biol.*, v. 57, p. 2-10, 1995.

STEVENS, M. & AUSTEN, K. F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cell. *Immunol. Today*, v. 10, p. 381-386, 1989.

SUMYEN, M. H.; GARIN, Y. J. F.; DEROUIN, F. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of na avirulent strain. *J. Parasitol.*, v. 81, n. 2, p. 325-327, 1995.

SWIETER, M.; MERGENHAGEN, S. E.; SIRAGANIAN, R. P. Microenviromental factors that influence mast cell phenotype and function. *Proc. Exp. Biol. Med.*, v. 199, n. 1, p. 22-33, 1992.

TAINSH, K. R. & PEARCE, F. L. Mast cell heterogeneity: evidence that mast cells isolated from various connective tissue locations in the rat display markedly graded phenotypes. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 98, p. 26-34, 1992.

TASAKA, K.; AKAGI, M.; MIYOSHI, K. Distribution of actin filaments in rat mast cells and its role in histamine release. *Agents Actions*, v. 18, p. 49-52, 1986.

TASAKA, K.; AKAGI, M.; MIYOSHI, K.; MIO, M. Role of microfilaments in the exocytosis of rat peritoneal mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 87, p. 213-221, 1988.

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- $\gamma$  production. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 3, p. 1119-1121, 1997.

WARE, P. L. & KASPER, L. H. Strain-specific antigens to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 55, p. 778-783, 1987.

WERK, R. Biology of *Toxoplasma gondii* host cell entry: The role of recognition and attachment for invasion of host cells. In: JAMIS, W. **Intracellular Parasit.**, CRC Press, Inc. Boca Raton: Moulder, p. 259-269, 1989.

WHERRY, J. C.; SCHREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. Regulation of gamma-interferon production by natural killer cells in SCID mice: roles of tumour necrosis factor and bacterial stimuli. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 1709-1715, 1991.

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

WOODISON, G. & SMITH, J. E. Identification of the dominant cyst antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 100, p. 389-392, 1990.

ZENNER, L.; DARCY, F.; CAPRON, A.; CESBRON-DELAUW, M. F. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 86-94, 1998.

As referências bibliográficas estão citadas de acordo com as normas da ABNT (NB-6023).