

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Mastócitos de camundongos BALB/c e
C57BL/6 e a susceptibilidade a infecção por
Toxoplasma gondii (cepas RH e ME-49)**

Gabriela Lícia Santos Ferreira

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutorado.

Uberlândia
Abril-2005

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Mastócitos de camundongos BALB/c e
C57BL/6 e a susceptibilidade a infecção por
Toxoplasma gondii (cepas RH e ME-49)**

Gabriela Lícia Santos Ferreira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Alice Diniz dos Santos

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado.

Uberlândia
Abril-2005

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Mastócitos de camundongos BALB/c e
C57BL/6 e a susceptibilidade a infecção por
Toxoplasma gondii (cepas RH e ME-49)**

Gabriela Lícia Santos Ferreira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Alice Diniz dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado.

Uberlândia

Abril-2005

Mastócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 e a susceptibilidade a infecção por *Toxoplasma gondii* (cepas RH e ME-49)

Tese defendida em 29 de abril de 2005.

Resultado: Aprovada

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Eloísa Amália Vieira Ferro
UFU- Uberlândia- MG

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior
FMTM- Uberaba- MG

Prof^ª. Dr^ª. Neide Maria Silva
UFU- Uberlândia- MG

Prof. Dr. José Roberto Mineo
UFU- Uberlândia- MG
Co-orientador

Prof^ª. Dr^ª. Ana Alice Diniz dos Santos
UFU- Uberlândia- MG
Orientadora

Aos meus pais, Eusa e Celso, e irmãos, Elias e Paulina, por demonstrarem um amor irrestrito, cada um ao seu jeito, que me transmite segurança e paz. Obrigada pelo apoio, carinho, compreensão e respeito; por terem sofrido junto comigo e me auxiliado a passar viva pelos piores dias da minha vida.

Especialmente às minha avós, Durvalina e Isabel, pois foram mulheres excepcionais.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Dr^a. Ana Alice Diniz dos Santos

Agradeço com muito carinho o companheirismo durante esta longa jornada, pois manteve-se firme e ativa, inclusive em momentos difíceis, nos quais perdi as esperanças. Obrigada pelo incentivo, pela paciência e orientação. Sem as suas palavras sempre afirmativas e positivas, não sei se teria conseguido. De todo o meu coração.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo

Agradeço o apoio e a atenção dispensada sempre que precisei. Sei que da sua maneira reservada e discreta preocupou-se comigo e respeitou as minhas dificuldades, obrigada pela compreensão, sinceramente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus a minha vida e a vida de todas as pessoas que me ajudaram.

À Prof^a. Dr^a. Eloísa Amália Vieira Ferro, a sensibilidade de falar as palavras perfeitas nos momentos certos, o carinho, a delicadeza e a amizade. Agradeço as atitudes que foram decisivas e direcionaram a minha vida profissional em diferentes momentos e a execução dos métodos imunohistoquímicos.

Ao meu amigo Junão, Antonio Thomás Junior, o auxílio durante a execução desta, mas principalmente pelo companheirismo, pela cumplicidade e por me sentir amparada com a certeza de ter um amigo verdadeiro.

À Prof^a. Dr^a. Neide Maria Silva, a possibilidade de realizar o meu sonho de trabalhar com ela, pessoa competente, criteriosa, delicada e humana. Agradeço ainda o auxílio para a realização desta tese como: a doação de camundongos C57BL/6, o auxílio durante os experimentos com a cepa ME-49 e as correções e sugestões.

À Juliana Gonzaga Oliveira, a amizade, o compartilhamento das mesmas dificuldades e ao seu filho João Pedro, pois uma criança desperta em nós sentimentos pueris.

À Fernanda Maria Santiago, a cumplicidade, o carinho, a amizade, os momentos felizes e os difíceis. Amiga essa etapa está quase acabando.

À Mariana e à Lorena, o auxílio à confecção desta e que foi de várias maneiras e em diferentes momentos. Vocês são meninas doces, prestativas, agradáveis e especiais, cada uma ao seu jeito.

À Belissa, a atenção e o auxílio na contagem dos campos parasitados.

Ao Márcio, a atenção e o auxílio nos cortes do material em historesina.

À Núbia, o carinho e o auxílio com os camundongos durante a confecção desta.

À Camila, o carinho, os momentos compartilhados e o seu jeito doce de tentar sempre enxergar o lado bom das pessoas.

Aos professores do Laboratório de Histologia, Prof. Gladstone, Prof. Marcos Silva, Prof. Marcelo Beletti, Prof^a. Zenaide, Prof^a Paula, Prof^a Márcia, Prof. Marco Aurélio, por todas as vezes que me auxiliaram e pela participação direta e inconsciente na estruturação do meu comportamento profissional, pois com vocês convivo e aprendo. Talvez nem saibam o quanto me influenciaram e a gratidão que sinto por ter sido acolhida neste Laboratório sempre com carinho. Obrigada!

Aos alunos de graduação ou de pós-graduação que participaram do meu dia-a-dia nos Laboratórios de Histologia e de Imunologia, por darem vida a estes ambientes com sorrisos, conversas e trabalho: Carla, Loyane, Nayane, Flávio, Andréia, Angélica, Idessânia, Karine, Rafael, Thiago, Eneida, Clarissa, Karen, Luciene, Miguel, Azul, Áurea.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Souza pelo carinho que tenho por você e por sentir que o sentimento é recíproco.

Ao Hélió Heinisch Werneck, o eficiente trabalho de ultra-microtomia e a convivência saudável de tantos anos de trabalho.

À Juscélia, por ter sido sempre prestativa e pela sensação de aconchego que a sua presença me desperta quando chego ao Laboratório de Histologia.

Ao Thiago e ao Rui, o auxílio na confecção das lâminas e muito mais pelo carinho e amizade.

Ao Max, que sempre me atendeu carinhosamente.

À Andréia, a atenção e o auxílio com os camundongos.

Ao Neto e Lucileide, o auxílio, a atenção e as palavras de incentivo.

À todos os colegas do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, a convivência agradável e construtiva.

Aos professores do Laboratório de Imunologia e do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, os valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva, da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, a solidariedade de ter cedido parte dos camundongos C57BL/6, sem ao menos me conhecer.

Às pessoas que não foram citadas, mas que me auxiliaram durante a elaboração desta tese com o seu trabalho ou com palavras de incentivo.

Dias e noites

Dias apavorantes
Noites horripilantes
Dias nublados
Noites cinzas
Dias na escuridão
Noites iluminadas pelo computador
Dias com sono
Noites em claro
Dias curtos
Noites também
Dias desesperadores
Noites mais ainda
Dias e noites angustiantes
Infelizes
Amargos
Dolorosos
Indesejáveis
Desrespeitosos
Agonizantes
Solitários
Desagradáveis

Enlouquecedores
Cansativos
Humilhantes
Inescrupulosos
Amaldiçoados
Letais
Mortificantes
Degradantes
Infinitos
Ofensivos
Abomináveis
Detestáveis
Indigestos
Desprezíveis
Odiosos
Infernais
Sem graça
Sem força
Sem vontade de viver
Sem vida
Morri.

Gabriela Lícia

RESUMO

No presente trabalho estudou-se: as características morfológicas e ultra-estruturais dos mastócitos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 e as modificações ocorridas nestes mastócitos após 24 e 48 horas de infecção com a cepa RH de *T. gondii*; o número de mastócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção com a cepa RH de *T. gondii*, utilizando-se a microscopia de luz; as características morfológicas dos mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6; as características morfológicas dos mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6, bem como as alterações morfológicas e quantitativas ocorridas nos mastócitos destes camundongos após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii* e/ ou tratados com o composto 48/80; as características histopatológicas do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, a microscopia de luz e a ocorrência de parasitismo no intestino delgado, fígado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii* e/ ou tratados com o composto 48/80 através da análise imunohistoquímica. À microscopia de luz e à microscopia eletrônica de transmissão os mastócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle apresentaram características morfológicas semelhantes tanto na sua forma, quanto na quantidade e nas características de seus grânulos citoplasmáticos assim como se observou que esses mastócitos ostentaram alterações morfológicas semelhantes, após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*. A análise do exsudato peritoneal revelou que em camundongos BALB/c ocorreu um aumento do número de mastócitos, neutrófilos e macrófagos após 24 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii* e que este influxo não foi observado em camundongos da linhagem C57BL/6. Ao contrário do observado no influxo de linfócitos que foi, estatisticamente, inferior em camundongos BALB/C, após 24 e 48 horas de infecção, quando

comparado ao influxo observado em camundongos C57BL/6. O número de mastócitos encontrados no intestino delgado de camundongos BALB/c foi estatisticamente superior ao encontrado em camundongos C57BL/6 e o número de campos parasitados foi maior em camundongos C57BL/6 após comparação com camundongos BALB/c. Tais resultados sugerem que mastócitos estão envolvidos na resposta inflamatória contra *T. gondii* e podem contribuir para a resistência da linhagem BALB/c e para a susceptibilidade da linhagem C57BL/6 contra *T. gondii*. Após comparação entre as duas linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6, notou-se que a diferença do número de linfócitos foi significativa após 24 e 48 horas de inóculo com PBS no exsudato peritoneal de camundongos C57BL/6. A análise morfológica das diferentes regiões do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) de camundongos BALB/c e C57BL/6 mostrou que os mastócitos foram encontrados, preferencialmente, na submucosa e na camada muscular. À microscopia de luz mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* ostentaram, nitidamente, alterações na quantidade e tamanho de seus grânulos citoplasmáticos. O número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii* foi superior em camundongos BALB/c. Os mastócitos foram, preferencialmente, encontrados no duodeno de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados e não infectados. A análise histopatológica do intestino delgado de camundongos, após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, revelou um infiltrado inflamatório mais intenso no intestino delgado de camundongos C57BL/6 do que no de camundongos BALB/c. *T. gondii* foi encontrado no intestino delgado, fígado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 e/ ou após infecção e tratamento como o composto 48/80, utilizando-se análise imunohistoquímica. No intestino delgado de camundongos BALB/c não se observou alteração no número de mastócitos após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii* e após 12 dias de tratamento com o composto 48/80.

Palavras-chaves: Mastócitos; *Toxoplasma gondii*; BALB/c; C57BL/6, cepa RH; cepa ME-49

ABSTRACT

In the present work it was studied: the morphological and ultrastructural characteristics of mast cells located in the peritoneal cavity of BALB/c and C57BL/6 mice and morphological and ultrastructural alterations of these mast cells after 24 and 48 hours of infection with RH strain of *T. gondii*; the number of the mast cells, neutrophils, macrophages and lymphocytes from peritoneal cavity of BALB/c and C57BL/6 mice after 24 and 48 hours of infection with RH strain of *T. gondii*, by optical microscopy; the morphological characteristics of mast cells located in the small intestine of BALB/c and C57BL/6 mice; and the morphological and quantitative features of mast cells located in the small intestine of BALB/c and C57BL/6 mice after 8 days of infection with ME-49 strain of *T. gondii* and/or treated with 48/80 compound; the histopathological changes of the small intestine BALB/c and C57BL/6 mice after 8 days of infection with ME-49 strain of *T. gondii* and tissue parasitism in this organ, liver and brain from BALB/c and C57BL/6 mice after 8 days of infection with ME-49 strain of *T. gondii* and/ or treated with 48/80 compound, by immunohistochemistry. The light and transmission electron microscopy analysis revealed that the mast cells from the peritoneal exsudate of BALB/c and C57BL/6 mice, presented similar characteristics like shape, cytoplasmic granules quantity and feature. Similarity, mast cells from the peritoneal exsudate of BALB/c and C57BL/6 *T. gondii* infected mice, presented similar characteristics between both lineages of mice. The light microscopy analysis showed an increased number of mast cells, neutrophil and macrophage in peritoneal exsudate of BALB/c mice after 24 hours of infection with RH strain of *T. gondii*, these influx didn't occur in C57BL/6 lineage. The number of mast cells in the small intestine from BALB/c mice was superior than the number of mast cells observed in the small intestine from C57BL/c mice. The number of parasitized field in the small intestine was superior in C57BL/6 mice. These results reveals the role of the mast cells

in the mechanisms of regulation of the inflammatory response against *T. gondii* and may be related with their sensitivity or resistance of the both mice lineage, BALB/c and C57BL/6. After comparison between mice lineage, BALB/c and C57BL/6, it was observed that the lymphocytes number was statistically significant after 24 and 48 hours of PBS inoculation in C57BL/6 mice's peritoneal exsudate. The light microscopy analysis from the different regions of the small intestine, duodenum, proximal jejunum, distal jejunum and ileum, of BALB/c and C57BL/6 mice showed that mast cells were found, preferentially, in the submucosa and muscle stratum. By light microscopy, mast cells from the small intestine of BALB/c and C57BL/6 mice after 8 days of infection with ME-49 strain of *T. gondii*, presented different characteristics in the quantity and shape of the cytoplasmic granules. The number of mast cells from the small intestine of BALB/c and C57BL/6 after 8 days of infection with ME-49 strain of *T. gondii*, presented superior in BALB/c mice. The mast cells were, preferentially, located in the duodenum from BALB/c and C57BL/6 mice infected or not infected. The histopathology analysis, after 8 days of infection with ME-49 strain of *T. gondii*, showed an inflammatory infiltrated more intense in the small intestine from C57BL/6 mice. *T. gondii* was found in the small intestine, liver and brain from BALB/c and C57BL/6 mice after 8 days of infection with ME-49 strain of *T. gondii*, and/or treated with 48/80 compound by immunohistochemistry. In the small intestine of BALB/c mice the number of mast cells doesn't change after 8 days of infection with ME-49 strain of *T. gondii*, and after 12 days of treatment with 48/80 compound.

Key words: Mast cells, *Toxoplasma gondii*; BALB/c; C57BL/6; strain RH; strain ME-49

ABREVIACÕES

1. **CD**: *cluster of differentiation*, sistema CD de nomenclatura que identifica moléculas de superfície
2. **CXCR**: receptor de quimiocina CXC
3. **FcεRI**: receptor I da porção Fc da IgE
4. **GALT**: tecido linfóide associado ao intestino
5. **GM-CSF**: fator estimulador de colônia macrófago-granulócito
6. **GPI**: glicosilfosfatidilinositol
7. **GTP**: nucleosídeo 5'-trifosfato de guanosina
8. **HIV**: vírus da imunodeficiência humana
9. **IBD**: doença inflamatória do intestino
10. **IDO**: indoleamina 2,3 dioxigenase
11. **IFN**: interferon
12. **IgE**: imunoglobulina da classe E
13. **IL**: interleucina
14. **LPS**: lipopolissacarídeo
15. **MALT**: tecido linfóide associado à mucosa
16. **MAPK**: *mitogen-activated protein kinase*, proteína pertencente ao grupo das quinases
17. **MCP**: proteína quimiotática de monócito
18. **MHC**: complexo principal de histocompatibilidade
19. **MIP**: proteína inflamatória de macrófago
20. **NF-κB**: fator de transcrição nuclear
21. **NGF**: fator de crescimento neural
22. **PAR**: receptor de proteinase ativada
23. **PBS**: solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH 7,2
24. **PCR**: reação em cadeia da polimerase
25. **PI**: inibidor de protease
26. **RANTES**: *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*, quimiocina

- 27. **SCF**: Fator estimulador de colônia
- 28. **SCID**: imunodeficiência grave combinada
- 29. **STAT**: *signal transducers and activators of transcription*, membro da família de fatores de transcrição Janus Kinase STAT
- 30. **Th**: subpopulação de linfócitos T auxiliares CD4⁺
- 31. **TLR**: receptor toll like
- 32. **TNF**: fator de necrose tumoral
- 33. **VEGF**: fator de crescimento do endotélio vascular
- 34. **VPF**: fator de permeabilidade vascular

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
2. Objetivos.....	24
3. Revisão da literatura.....	27
3.1. Mastócitos.....	28
3.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	38
3.2.1. Histórico e taxonomia.....	38
3.2.2. Morfologia.....	39
3.2.3. Formas evolutivas e ciclo biológico.....	39
3.2.4. Invasão de células hospedeiras por <i>T. gondii</i>	41
3.2.5. Vias de infecção e epidemiologia.....	43
3.2.6. Toxoplasmose e a resposta imunológica contra <i>T. gondii</i>	44
3.2.7. Cepas de <i>T. gondii</i>	50
3.3. Interação entre mastócitos e <i>T. gondii</i>	52
4. Material e métodos.....	54
4.1. Animais.....	55
4.2. Parasitas e infecção.....	55
4.2.1. Manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i> e sua inoculação em camundongos BALB/c e C57BL/6.....	55
4.2.2. Manutenção da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i> e sua inoculação em camundongos BALB/c e C57BL/6.....	57
4.3. Microscopia de luz.....	58
4.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....	60
4.5. Contagem do número de mastócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	61
4.6. Contagem do número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	62
4.7. Análise histopatológica.....	63
4.8. Imunohistoquímica.....	63
4.9. Estudo quantitativo do parasitismo.....	64
4.10. Contagem do número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c tratados com o composto 48/80.....	65
4.11. Análise estatística.....	66
5. Resultados.....	67
5.1. Mastócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de <i>T. gondii</i>	68
5.1.1. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.....	68
5.1.2. Valores absolutos do número de mastócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos presentes no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de <i>T. gondii</i>	70

5.2. Mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	73
5.2.1. Microscopia de luz.....	73
5.2.2. Valores absolutos do número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	74
5.2.3. Análise histopatológica do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção pela cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	74
5.2.4. Análise imunohistoquímica do intestino delgado, fígado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção pela cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	75
5.3. Análise do intestino delgado, cérebro e fígado de camundongos BALB/c após 8 dias infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i> e tratados com o composto 48/80 durante 12 dias.....	76
5.3.1. Valores absolutos do número de mastócitos do intestino delgado.....	76
5.3.2. Análise imunohistoquímica de campos parasitados no intestino delgado, cérebro e fígado de camundongos BALB/c.....	78
6. Documentação.....	79
7. Discussão.....	98
7.1. Análise do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de <i>T. gondii</i>	99
7.2. Intestino delgado, fígado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	107
7.3. Mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c após 8 dias infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i> e tratados com o composto 48/80 durante 12 dias.....	113
8. Conclusões.....	118
9. Referências bibliográficas.....	122

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Mastócitos e basófilos são derivados de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ da medula óssea onde iniciam sua diferenciação, entram na circulação sanguínea e dirigem-se para diferentes tecidos ou órgãos e nestes microambientes completam sua maturação (LIN & BEFUS, 1999; KAWAKAMI & GALLI, 2002; NEEL et al., 2004). Portanto, mastócitos são encontrados no tecido conjuntivo e estão amplamente distribuídos pelo corpo das espécies de vertebrados já estudadas sendo mais freqüentes em mucosas, ao longo dos vasos sanguíneos e linfáticos (HENZ et al., 2001). São encontrados também em cavidades: peritoneal, seios linfáticos medulares, corticais e subcapsulares de vários linfonodos (CHIARINI-GARCIA et al., 2000; SANTOS et al., 2003). Mastócitos são abundantes em áreas que entram em contato direto com substâncias exógenas possibilitando sua interação com o ambiente e controlando infecções bacterianas, parasitárias e outras. Portanto, os mastócitos podem interagir com células e elementos de vários tecidos, órgãos e cavidades do corpo (WONG et al., 2003; HENZ et al., 2001).

A heterogeneidade dos mastócitos designou uma terminologia comumente utilizada para distinguir duas subpopulações de mastócitos: mastócitos de tecido conjuntivo e mastócitos de mucosa (HILL & MARTIN, 1998).

O conteúdo dos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos contém mediadores químicos que podem ser liberados após estímulo (CALDERÓN et al., 1998; KAWAKAMI & GALLI, 2002; MAYR et al., 2003; MALAVIYA et al., 2004). Esses mediadores químicos podem desencadear inúmeras reações fisiológicas e patológicas ligadas à hipersensibilidade imediata ou à uma resposta imunológica protetora contra parasitas (KAWAKAMI & GALLI, 2002).

A participação de mastócitos em respostas imunológicas, reações inflamatórias e parasitárias tem sido amplamente investigada. Mastócitos, comprovadamente, participam da resposta imunológica contra *Schistosoma mansoni*, *Toxocara vitulorum*, *Eimeria nieschulzi*, *Nippostrongylus brasiliensis*,

Strongyloides venezuelensis, *Giardia lamblia*, *Clostridium difficile*, *Trichinella spiralis*, *Escherichia coli*, *Toxoplasma gondii* (HUNTLEY et al., 1985; HARDIN et al., 1997; CALDERÓN et al., 1998; ONAH et al., 2000; FRIEND et al., 2000; NEVES et al., 2003; McDERMOTT et al., 2003; MALAVIYA et al., 2004; GIL et al., 2002; FERREIRA et al., 2004).

Mastócitos participam da imunidade inata que, juntamente, com a imunidade adaptativa formam um sistema e são capazes de desempenhar importante papel na regulação da resposta imune, inclusive em mucosas, a partir da liberação de citocinas tanto de perfil Th2 quanto de perfil Th1 (MAYR et al., 2003; McGUINNESS et al., 2003; BRANDTZAEG & PABST, 2004; SAMPSON, 2005; JAMES, 2005; KATAOKA et al., 2005).

T. gondii é um protozoário que possui ciclo biológico heteroxênico e potencialmente é capaz de parasitar qualquer tipo celular. Para o processo de invasão às células hospedeiras *T. gondii* utiliza elementos estruturais do citoesqueleto e organelas secretórias como micronemas, roptrias e grânulos densos (WERK, 1989; BLACK & BOOTHROYD, 2000; CARRUTHERS, 2002; DUBEY, 2004; DENKERS & BUTCHER, 2005).

A toxoplasmose é usualmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, entretanto em indivíduos imunocomprometidos pode resultar em lesões debilitantes e até mesmo letais. A infecção pode ser reativada a partir do rompimento de cistos teciduais, disseminação de bradizoítas e conversão em taquizoítas (WONG & REMINGTON, 1993; DUBEY, 2004).

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 à produção de citocinas como: IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 (GAZZINELLI et al., 1991; HUNTER et al., 1995; MacDONALD & MONTELEONE, 2001).

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, que por sua vez será resistente ou susceptível (BOHNE et al., 1993).

O comportamento dos mastócitos frente à infecção por *T. gondii* tem sido investigado. Mastócitos de ratos Sprague-Dawley foram estudados após interação com *T. gondii* e alterações marcantes foram observadas, tanto em mastócitos quanto em taquizoítas (HENDERSON & CHI, 1998). Mastocitose gastrintestinal e cutânea foi relatada em paciente com meningoencefalite toxoplásmica (KOEPPPEL et al., 1998). *Calomys callosus* infectados por *T. gondii* apresentaram aumento no número de mastócitos da região ocular, quando comparados a roedores não infectados, além de um infiltrado de células inflamatórias (GIL et al., 2002). Resultados semelhantes foram notados em mastócitos do exsudato peritoneal de *C. callosus*, que apresentaram-se em processo de desgranulação após infecção por *T. gondii*, além de um influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais infectados (FERREIRA et al., 2004). O influxo de neutrófilos pode ser atribuído à presença de CXCR2, já que este não ocorre em camundongos deficientes de CXCR2 infectados pela cepa VEG de *T. gondii* (DEL RIO et al., 2001). Mastócitos de órgãos como linfonodos e intestino delgado, especialmente, o íleo apresentaram-se em processo de desgranulação, sugerindo a participação destes na resposta imune contra *T. gondii*, também nestes órgãos (FERREIRA et al., 2004).

A importância de mastócitos na resposta imunológica é descrita, classicamente, na imunidade contra helmintos ou em reações alérgicas, porém, atualmente esta participação tem sido mais intensamente explorada e outros papéis em diferentes infecções têm sido investigados. Mastócitos são células que participam das respostas imunológicas contra diferentes parasitas, a partir da produção de uma grande variedade de mediadores químicos capazes de determinar perfis de respostas ou recrutar vários tipos celulares. São células que podem ser maléficas para o hospedeiro como ocorre na hipersensibilidade tipo I ou benéficas como nas respostas contra helmintos, sendo assim, conduzem tanto respostas protetoras quanto respostas prejudiciais. Possuem ainda grande importância no desenvolvimento de processos inflamatórios e na ativação da imunidade adaptativa. Estes estudos têm contribuído para o entendimento do comportamento dos mastócitos frente a diferentes substâncias e parasitas e

esclarecido seu papel em diversas respostas imunológicas. A imunidade inata e a imunidade adaptativa são sistemas que identificam e eliminam agentes estranhos. Particularmente, a imunidade inata, que conta com a atuação dos mastócitos, desenvolve a primeira linha de defesa contra patógenos através do reconhecimento antigênico e da sinalização para a imunidade adaptativa. Esta última característica da imunidade inata ressalta sua importância durante o desenvolvimento da resposta imunológica.

Avanços consideráveis no entendimento sobre a resposta imune contra parasitas têm emergido nos recentes anos com a aplicação de conceitos da imunologia fundamental. Uma ampla variedade de respostas induzidas por parasitas apresenta um padrão de produção de citocinas dominantes de perfil Th1 ou Th2, derivadas de subtipos de linfócitos. A dicotomia das citocinas, muitas vezes, é relatada em uma visão simplificada da resposta imune induzida pelo parasita e em sua influência na resistência do hospedeiro ou na doença. Poucas respostas são puramente tipo 1 ou tipo 2 e podem estar acompanhadas por citocinas inibitórias. Assim, tais respostas podem guiar para a proteção do hospedeiro contra as consequências imunopatológicas potenciais de uma resposta dominante não regulada. Nota-se, então, que muitos processos de resistência e doença de hospedeiros requer uma orquestração de ambas respostas.

Diante das considerações torna-se importante estabelecer a participação dos mastócitos nos mecanismos de regulação da resposta inflamatória mediada pela infecção experimental por *T. gondii*, já que o hospedeiro pode ser prejudicado quando desenvolve um perfil de resposta que privilegia a subpopulação Th2.

Objetivos

2- OBJETIVOS

2.1. Descrever as características morfológicas e ultra-estruturais dos mastócitos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6;

2.2. Determinar as modificações nos mastócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção com a cepa RH de *T. gondii*, a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de transmissão;

2.3. Avaliar quantitativamente o número de mastócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção com a cepa RH de *T. gondii*, utilizando-se microscopia de luz;

2.4. Descrever as características morfológicas dos mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6;

2.5. Determinar as modificações nos mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, a microscopia de luz e avaliar quantitativamente o número destes mastócitos;

2.6. Descrever as características histopatológicas do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, a microscopia de luz;

2.7. Observar a ocorrência de parasitismo no intestino delgado, fígado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, utilizando-se análise imunohistoquímica;

2.8. Avaliar quantitativamente o número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, tratados com o composto 48/80, a microscopia de luz;

2.9. Observar a ocorrência de parasitismo no intestino delgado, fígado e cérebro de camundongos BALB/c após 8 dias de infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, tratados com o composto 48/80, utilizando-se análise imunohistoquímica.

Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Mastócitos

“Mastzellen” foi o nome, inicialmente, dado aos mastócitos pelo estudante de medicina Paul Ehrlich em 1878 (apud GALLI et al., 1999), o que significa células bem alimentadas, em decorrência do grande número de grânulos citoplasmáticos proeminentes. Tais grânulos fizeram com que Paul Ehrlich (1878 apud GALLI et al., 1999) pensasse que se tratava de material fagocitado. Contudo foi, provavelmente, Elie Metchnikoff em 1892 (apud GALLI et al., 1999) que sugeriu uma função fagocítica para os mastócitos e a provável participação dos mesmos na defesa do organismo.

Mastócitos são células do tecido conjuntivo amplamente distribuídas pelo corpo das espécies de vertebrados já estudadas sendo mais frequentes em mucosas, ao longo dos vasos sanguíneos e linfáticos (HENZ et al., 2001). São encontrados também em cavidades: peritoneal, seios linfáticos medulares, corticais e subcapsulares de vários linfonodos (CHIARINI-GARCIA et al., 2000; SANTOS et al., 2003). Tal distribuição dos mastócitos possibilita um contato direto com substâncias exógenas, interação com o ambiente e controle de infecções bacterianas, parasitárias e outras (WONG et al., 2003; HENZ et al., 2001).

Mastócitos e basófilos originados na medula óssea completam sua maturação em diferentes microambientes sob a influência de mediadores químicos. O processo de maturação em diversos locais gera populações heterogêneas de mastócitos que possuem padrões próprios de expressão de proteínas de superfície celular e de constituintes dos grânulos citoplasmáticos (LIN & BEFUS, 1999; KAWAKAMI & GALLI, 2002; NEEL et al., 2004).

A heterogeneidade dos mastócitos tem sido estudada principalmente nas últimas três décadas, em diferentes tecidos e exibe variações nas suas características morfológicas, bioquímicas, funcionais, histoquímicas e secretórias. Estas alterações designaram uma terminologia comumente utilizada para distinguir duas subpopulações de mastócitos: mastócitos de tecido conjuntivo e mastócitos de mucosa (HILL & MARTIN, 1998). A primeira subpopulação encontra-se geralmente em volta de vasos e a segunda se restringe às mucosas (MACEDO, 1989). Tal heterogeneidade, de populações de mastócitos, restrita a dois fenótipos 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), em propriedades histoquímicas, na reatividade a secretagogos, no tipo de protease presente nos grânulos e também na dependência de fatores de crescimento (NAWA et al., 1994).

Porém, tal classificação de mastócitos 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 nas suas propriedades histoquímicas e funcionais em resposta a diferentes agentes. Tais observações confirmam a existência de heterogeneidade fenotípica (SANTOS et al., 2003; CHIARINI-GARCIA et al., 2000) e realçam o uso inadequado dos termos mastócitos de mucosa e mastócitos de tecido conjuntivo, pois estes representam dois fenótipos extremos.

Os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos contêm grande variedade de mediadores químicos que podem ser liberados após ativação celular por diferentes mecanismos: via imunoglobulina E (IgE) dependente ou via IgE independente (CALDERÓN et al., 1998; KAWAKAMI & GALLI, 2002). O primeiro mecanismo é assim denominado pois representa um processo dependente da ligação da IgE a um receptor presente na superfície celular, inclusive de mastócitos, chamado FcεRI (receptor I da porção Fc da IgE) que possui alta afinidade para ligar-se a IgE, este mecanismo é predominante em reações alérgicas. O segundo mecanismo é, conseqüentemente, independente de

IgE, ou ainda, do FcεRI e pode ser desencadeado através de substâncias como ionóforos de cálcio, composto 48/80, substância P, produtos microbianos ou até mesmo mediadores inflamatórios (CALDERÓN et al., 1998; MAYR et al., 2003; MALAVIYA et al., 2004).

A liberação de mediadores químicos por mastócitos ativados pode ocorrer através de três processos: (1) *secreção de mediadores pré-formados e estocados em grânulos citoplasmáticos* (exemplos: histamina, heparina, sulfato de condroitina, aminas vasoativas, proteína básica principal, carboxipeptidases, catepsina, peroxidase, hidrolases ácidas, proteases neutras como quimases e/ou triptases, alguns fatores de crescimento); (2) *a síntese “de novo” de mediadores lipídicos pró-inflamatórios* (exemplos: prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas) e (3) *a síntese e secreção de citocinas e quimiocinas* (exemplos: fator de necrose tumoral (TNF), proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP1α), fator de permeabilidade vascular (VPF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), proteína quimiotática de monócito 1 (MCP1), fator estimulador de colônia macrófago- granulócito (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16 e provavelmente outras) (LEE et al., 1986; PEARCE, 1986; KAWAKAMI & GALLI, 2002). A presença e concentração de cada um destes mediadores variam conforme a espécie e/ou as características do microambiente ou do tecido nos quais se localizam em uma mesma espécie (PEARCE, 1986; STEVENS & AUSTEN, 1989); assim como entre espécies. O exemplo clássico refere-se a serotonina que em roedores (AUSTEN, 1984) e no gambá *Didelphis albiventris* (MACHADO, 1980) é um dos constituintes dos grânulos. Ainda, a heparina presente em grânulos de mastócitos da mucosa do íleo do gambá *D. albiventris* (SANTOS & MACHADO, 1994).

Mediadores químicos liberados de grânulos de mastócitos ativados podem desencadear inúmeras reações fisiológicas e patológicas ligadas à hipersensibilidade imediata (processos alérgicos, anafilaxia ou ataques asmáticos) ou à uma resposta imunológica protetora contra parasitas. Em outras palavras, as funções desempenhadas pelos mastócitos se desencadearão a partir

da liberação de tais mediadores, há de considerar-se o tipo de mediador e a sua quantidade (KAWAKAMI & GALLI, 2002).

O processo de liberação do conteúdo dos grânulos dos mastócitos pode ocorrer através de dois mecanismos básicos: desgranulação gradual ou “peacemeal” quando há liberação de mediadores químicos estocados sem extrusão dos grânulos citoplasmáticos (DIMITRIADOU et al., 1990; KOPS et al., 1990); e desgranulação anafilática, na qual ocorre fusão dos grânulos entre si e destes com a membrana plasmática, levando à solubilização e eliminação dos mediadores químicos dos grânulos (ASKENASE, 1980; FRIEDMAN & KALINER, 1988). Independente do processo de desgranulação, gradual ou anafilática, esta ocorrerá após ativação dos mastócitos, de maneira independente ou dependente da IgE, e contará com eventos concomitantes como o aumento da transcrição de genes e o rearranjo do citoesqueleto (TODA et al., 2004; TORIGOE et al., 2004). Este último exerce um papel importante não somente para a extrusão de grânulos ou de seu conteúdo, mas também para a sua regranulação (MIO & TASAKA, 1989). Tal fenômeno pode ser comprovado pela ação da toxina A de *Clostridium difficile* que é capaz de romper microfilamentos de actina e reduzir a capacidade de liberação de histamina dos grânulos dos mastócitos (CALDERÓN et al., 1998).

Existe uma complexa interação entre mediadores pró-inflamatórios, citocinas e células FCεRI⁺, como mastócitos e basófilos. Por exemplo, os efeitos de algumas citocinas como IL-3, IL-5 e GM-CSF, produzidas por mastócitos, podem estimular a secreção de histamina e de IL-4 por basófilos. Similarmente, o fator de crescimento neural (NGF) e a IL-18, que possuem uma ação autócrina, podem estimular a liberação de citocinas e de histamina por basófilos, que por sua vez liberam IL-4, capaz de atuar de maneira Parácrina, induzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (prostaglandina D2 e leucotrieno C4) e outras citocinas pelos mastócitos. Ainda, de acordo com estas colocações, citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-3) ou Th1 (IL-18) podem induzir alterações nas vias intracelulares biosintéticas de basófilos e mastócitos, alterando processos alérgicos inflamatórios. Outro mediador de ação autócrina é o SCF (fator

estimulador de colônia), considerado um importante fator de crescimento, de diferenciação e de quimiotaxia para mastócitos humanos, que é produzido por mastócitos pulmonares e capaz de sustentar a hiperplasia de mastócitos durante uma reação asmática. Esses resultados enfatizam as interações entre células FCεRI⁺ e seus mediadores químicos (MARONE et al., 2005).

Mediadores químicos liberados por mastócitos podem guiar uma resposta imunológica durante episódios de reações alérgicas. Um exemplo é uma serina protease, a triptase, encontrada quase que, exclusivamente, em grânulos de mastócitos, a qual pode agir como um potente modulador do extravasamento vascular e da resposta inflamatória. A liberação de triptase de mastócitos e subsequente ativação de PAR-2 (receptor 2 de proteinase ativada) estão implicados na patogênese da injúria pulmonar (ITOH et al., 2005).

O curso das doenças alérgicas ocorre, tipicamente, em duas fases: reação de hipersensibilidade imediata (após, aproximadamente, uma hora pós-exposição ao alérgeno) e a reação de fase tardia (após, aproximadamente, 12 horas ou mais pós-desafio com o alérgeno). Os mastócitos são células efetoras fundamentais na reação de hipersensibilidade imediata e liberam histamina, proteases, citocinas inflamatórias, quimiocinas e mediadores lipídicos. A reação de fase tardia recruta células inflamatórias como eosinófilos, basófilos, linfócitos T, neutrófilos e macrófagos para o sítio de inflamação alérgica. Quimiocinas como eotaxina 1, eotaxina 2, RANTES, MCP3, MCP4 e MIP1α desenvolvem um papel pivô no direcionamento da reação de fase tardia, pois afetam ambos: a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e desenvolvem um gradiente quimiotático para o recrutamento de células. A reação de fase aguda, não é responsável apenas pelos sinais clínicos iniciais da inflamação alérgica, mas em essência, também, é responsável pela geração da resposta de fase tardia e da doença alérgica crônica (GELFAND, 2004; MIYAZAKI et al., 2005).

Algumas características sugerem que células FCεRI⁺ possuem um papel central nas reações alérgicas inflamatórias pulmonares: a localização de mastócitos em determinados compartimentos pulmonares, a habilidade de basófilos em migrar para sítios de inflamação alérgica, a força efetora de ambos

tipos celulares, a presença de receptores relacionados com a diferenciação microbiana e a sua plasticidade na resposta a diferentes antígenos. Contudo, mastócitos diferem imunológica, bioquímica e farmacologicamente de basófilos, que são células com papéis distintos na orquestração da inflamação das vias aéreas. Mais do que isso, diferentes subpopulações de mastócitos, ou mastócitos em diferentes estágios de maturação, desempenham também diferentes papéis protetores durante os processos alérgicos (MARONE et al., 2005).

Experimentalmente, algumas substâncias (composto 48/80, veneno de abelha, ionóforos de cálcio) podem ser utilizadas para o estudo dos processos de desgranulação dos mastócitos e suas consequências, possibilitando se observar seu papel, por exemplo, durante as reações alérgicas (ENERBACK, 1966c; PEARCE, 1986; MOON et al., 2004). Porém, a participação de mastócitos em respostas imunológicas, reações inflamatórias e parasitárias tem sido amplamente investigada, como observado em helmintíases intestinais, nas quais a hiperplasia de mastócitos faz com que estes sejam considerados células efectoras e/ou reguladoras na expulsão de certos parasitas intestinais, mediada pelo sistema imune (NAWA, 1994). Os mastócitos possuem ainda atividade citotóxica contra esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, pois liberam leucotrienos e agem sinergisticamente com eosinófilos (HENDERSON & CHI, 1998). Tal interação celular entre mastócitos e eosinófilos e o aumento do número destes tipos celulares podem ser notados ainda após infecção experimental por *Toxocara vitulorum* em fragmentos intestinais de búfalos (NEVES et al., 2003).

Outros estudos demonstram a participação de mastócitos em infecções como por *Eimeria nieschulzi* ou por *Nippostrongylus brasiliensis*, nas quais observa-se um substancial aumento do número de mastócitos de mucosa intestinal (HUNTLEY et al., 1985); ou por *Strongyloides venezuelensis* na qual há evidências de que mastócitos são ativos durante sua expulsão (ONAH et al., 2000). Durante infecções por *Giardia lamblia* pode ocorrer recrutamento de mastócitos de mucosa e mastócitos de tecido conjuntivo na fase de pico da infecção (HARDIN, 1997). Já *Clostridium difficile* é capaz de liberar toxina A, substância indutora da secreção de mediadores inflamatórios por mastócitos

(CALDERÓN et al., 1998). Outro exemplo pode ser observado após infecção por *Trichinella spiralis* que resulta na liberação de proteases por mastócitos de submucosa do jejuno e mastócitos do baço de camundongos (FRIEND et al., 2000; McDERMOTT et al., 2003). *T. spiralis* induz também a expressão de protease serina 9 (mMCP-9) em mastócitos da submucosa do jejuno e do baço de camundongos. Esta protease é, primeiramente, expressa por mastócitos da submucosa do jejuno, antes de ser detectada em qualquer outra célula, inclusive em células esplênicas (FRIEND et al., 2000).

Algumas alterações encontradas em carneiros infectados, experimentalmente, com *Oestrus ovis* e *Trichostrongylus colubriformis* estão associadas a modificações significantes nas populações de mastócitos, leucócitos e eosinófilos dos tratos digestório e respiratório (YACOB et al., 2002).

Após análise microscópica e morfométrica de células, da mucosa do íleo no sítio de infecção, de gerbis infectados com parasitas adultos de *Taenia solium* observou-se um discreto aumento do número de plasmócitos, linfócitos e fibroblastos, um aumento moderado no número de eosinófilos e neutrófilos, porém um grande aumento do número de células caliciformes e mastócitos. A concentração de histamina do fluido intestinal, também, aumentou nos animais infectados por *T. solium*, seguindo um comportamento similar ao observado no número de mastócitos. Avila e colaboradores (2002) sugerem que o aumento do número de células caliciformes e de mastócitos pode estar relacionado com a expulsão de *T. solium* em gerbis.

Camundongos infectados por *Schistosoma japonicum* são resistentes ao nematódeo *Strongyloides venezuelensis*. O número de adultos *S. venezuelensis* contados em camundongos, após seis semanas de infecção por *S. japonicum*, foi significativamente diminuído. Observou-se números significantes de larvas de *S. venezuelensis* que foram eliminadas durante três dias do pulmão de camundongos infectados por *S. japonicum*, enquanto que os dados histológicos revelam que a infecção está associada com forte infiltração eosinofílica pulmonar. Além disso, vermes adultos de *S. venezuelensis* implantados no duodeno de camundongos infectados por *S. japonicum* não podem se estabelecer no intestino, estando este

resultado associado com a mastocitose na mucosa. A ativação de eosinófilos e mastócitos intestinais está correlacionada com a elevada expressão de RNAm de IL-3, IL-4 e IL-5 em camundongos infectados por *Schistosoma japonicum* (MARUYAMA et al., 2000).

Há evidências convincentes de que mastócitos são importantes na fisiopatologia da infecção contra bactérias Gram-negativas, como potencialização da morte bacteriana, através do recrutamento de células fagocitárias e da liberação de moléculas imunomodulatórias como TNF- α . Mastócitos incubados com fímbrias de *Escherichia coli* tipo 1 cepa ORN103 exibiram uma forte resposta proliferativa, especialmente após 2 dias de incubação. Utilizando um camundongo com cistite urinária, observou-se que fímbrias de *E. coli* tipo 1 podem induzir a hiperplasia de mastócitos da bexiga durante a infecção e a liberação de histamina, leucotrienos e TNF- α pelos mesmos. Camundongos deficientes em mastócitos apresentaram redução da morte bacteriana na bexiga em relação a camundongos selvagens. A importância de mastócitos na patogênese de infecções do trato urinário por bactérias Gram-negativas pode ocorrer em resposta à secreção de mediadores químicos e após estímulo bacteriano (MALAVIYA et al., 2004).

Além das respostas a parasitas e bactérias, mastócitos podem participar das respostas imunes contra vírus como HIV-1. Mastócitos humanos e basófilos são as principais células que expressam receptores de alta afinidade para IgE (Fc ϵ RI) e, durante a infecção por HIV-1, são produzidos altos níveis de IgE. Em pacientes HIV-1 positivos ocorre aumento da prevalência e da severidade das reações alérgicas e das reações a drogas. Sendo assim, mastócitos e basófilos podem ser mediadores na infecção por HIV-1 (MARONE et al., 2001).

Outro aspecto que deve ser destacado é a participação dos mastócitos na imunidade inata que, juntamente, com a imunidade adaptativa formam um sistema de defesa que permite a identificação e eliminação de agentes estranhos. A imunidade inata desenvolve a primeira linha de defesa contra patógenos através do reconhecimento antigênico e da sinalização para a imunidade adaptativa (McGUINNESS et al., 2003). O reconhecimento antigênico depende

da apresentação de moléculas estranhas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e os mastócitos expressam MHC e moléculas co-estimulatórias, portanto podem comportar-se como células apresentadoras de antígenos (VINCENT-SCHNEIDER et al., 2001; GALLI et al., 2005). Mastócitos são capazes também de desempenhar importante papel na regulação da resposta imune através da secreção de seus mediadores químicos. Tais mediadores podem influenciar as funções de linfócitos T “naive” induzindo sua diferenciação, preferencialmente, em uma subpopulação de linfócitos produtores de citocinas de perfil Th2 e estimular a síntese de IgE por linfócitos B (MAYR et al., 2003).

Mastócitos de tecido conjuntivo são capazes de produzir citocinas, assim como células NK, e participar de respostas imunes com liberação de citocinas tanto de perfil Th2 quanto de perfil Th1. O perfil Th1 foi observado em mastócitos de infiltrado tumoral de mama e, tal participação está relacionada a um prognóstico favorável. Mastócitos podem ainda expressar STAT4, assim como linfócitos B, linfócitos T, células NK, macrófagos e células dendríticas. STAT4 é uma proteína que possui importante papel na indução da produção de citocinas, em células imunocompetentes, capaz de ativar genes relacionados com a produção de citocinas de perfil Th1 (KATAOKA et al., 2005).

Mastócitos são células que participam da imunidade de mucosas: pulmonar, intestinal e oral. A tolerância oral demonstra como o sistema imune pode, eficientemente, inibir a resposta imune contra antígenos através da via oral. O comportamento da via oral revela uma intrincada rede de fatores do sistema imune envolvida em sua tolerância, como: fatores genéticos, flora intestinal, dose do antígeno, influência de processos digestivos em células apresentadoras de antígeno (células dendríticas e células epiteliais intestinais) e apresentação antigênica a linfócitos T. No caso de um contato no trato gastrintestinal com antígenos, potencialmente prejudiciais, uma resposta inflamatória conduzida por um subtipo de linfócitos T será ativada para a proteção do hospedeiro, porém no caso de um contato com nutrientes ou organismos inofensivos uma resposta

conduzida por linfócitos T supressores será ativada e levará a uma tolerância imunológica (SAMPSON, 2005).

Sampson (2005) relata ainda que grandes avanços têm sido realizados no entendimento da imunidade da mucosa, na tolerância oral, nas propriedades estruturais de alérgenos, na imunopatogênese e nas desordens causadas pela hipersensibilidade a alimentos. O trato gastrointestinal do corpo humano possui a maior área de superfície exposta ao meio externo e confronta-se com uma grande quantidade de carga antigênica presente em proteínas de alimentos, organismos comensais e patogênicos. O sistema imune da mucosa intestinal tem extraordinária habilidade em distinguir entre proteínas derivadas de patógenos e proteínas derivadas de alimentos ou organismos comensais (SAMPSON, 2005). Segundo James (2005), esta capacidade de proteção (contra patógenos) e, ao mesmo tempo, de tolerância (a produtos alimentares e a flora microbiana comensal residente no intestino) deve estar em harmonia. Qualquer desequilíbrio nestes mecanismos imunológicos fundamentais pode desencadear distúrbios na mucosa intestinal. Há duas doenças que exemplificam tais distúrbios: doença celíaca, caracterizada pela perda de tolerância a peptídeos alimentares e, doença de Crohn's, esta representa uma complexa desordem que envolve uma resposta imune inata anormal a microflora intestinal (JAMES, 2005).

A manutenção da homeostase na extensa e vulnerável mucosa está protegida por defesas imunes especializadas e anti-inflamatórias, como a formação e exportação de anticorpos IgA secretores e a indução da tolerância contra substâncias solúveis, como bactérias comensais ou proteínas alimentares. Além da habilidade em distinguir antígenos na superfície mucosa, outra característica do sistema de mucosa é a indução da imunidade sistêmica, que depende da carga antigênica enviada para os linfonodos (via aferente) e para o baço (via sangüínea). A principal fonte de linfócitos B de mucosa, produtores de IgA, são as placas de Peyer do intestino delgado, estruturas MALT (tecido linfóide associado à mucosa) típicas, encontradas em humanos, roedores e coelhos (BRANDTZAEG & PABST, 2004).

Deve-se ressaltar ainda que há uma estreita associação entre as respostas alérgicas das vias aéreas (já relatadas anteriormente) com os processos inflamatórios alérgicos desencadeados no esôfago, estômago e intestino delgado. Em outras palavras, há semelhanças entre as respostas imunológicas ocorridas nas mucosas (SAMPSON, 2005).

3.2. *Toxoplasma gondii*

3.2.1. Histórico e taxonomia

T. 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 (PFEFFERKORN, 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 Eucocciciida, subordem Eimeriina e família Sarcocystidae (WERK, 1989).

3.2.2. Morfologia

O protozoário possui forma arqueada, mede aproximadamente 6 µm de comprimento e 2 µm de largura e apresenta duas regiões distintas: uma extremidade anterior afilada onde situa-se o aparelho apical e outra no pólo oposto arredondada. Possui núcleo, numerosas organelas (micronemas, grânulos densos, conóide, mitocôndrias, retículo endoplasmático, citoesqueleto, complexo de Golgi, ribossomas, grânulos de amilopectina) 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 (DUBEY et al., 1997).

3.2.3. Formas evolutivas e ciclo biológico

T. gondii é um protozoário que possui ciclo biológico heteroxênico, ou seja, aquele que desenvolve-se em hospedeiros definitivos (fase sexuada) representados pelos felídeos domésticos e selvagens, e em hospedeiros intermediários (fase assexuada) representados por diferentes espécies de mamíferos, aves e até mesmo alguns tipos de invertebrados (WERK, 1989; DUBEY, 2004).

T. gondii possui três formas evolutivas: taquizoítas, bradizoítas (em cistos teciduais) e esporozoítas (no interior de 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 taquizoítas e bradizoítas) e uma fase sexuada que ocorre apenas nos hospedeiros definitivos:

os felídeos domésticos e selvagens (nestes encontram-se oocistos) (DUBEY et al., 1997).

A 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, com a produção de macro e microgametas no intestino do hospedeiro definitivo. A fusão dos gametas produz um zigoto, que secreta uma membrana cística rígida, que é eliminado juntamente com as fezes como oocisto não esporulado. Durante a infecção aguda um gato pode excretar por volta de 100 milhões de oocistos por dia (KASPER & BOOTHROYD, 1993; MONTOYA & LIENSEFELD, 2004). Após 1 a 5 dias de exposição ao ar e à temperatura ambiente, o oocisto esporula e produz dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítas (DUBEY et al., 1997). Então, tais oocistos tornam-se altamente infecciosos e podem permanecer viáveis por muitos anos no solo ou serem acidentalmente ingeridos por humanos e outros animais (KASPER & BOOTHROYD, 1993).

Quando ingeridos os oocistos liberam os esporozoítas que 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 em células nucleadas, desenvolvem pseudocistos ou vacúolos parasitóforos (importante para proteção contra mecanismos de defesa da célula hospedeira) e multiplicam-se rapidamente por endodiogenia (processo semelhante à divisão binária, no qual duas células filhas formam-se no interior da célula mãe). Após um número desconhecido de divisões ocorre o rompimento das células hospedeiras e a liberação dos taquizoítas com posterior infecção de células adjacentes (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004).

Após alguns dias à infecção sistêmica, pelos taquizoítas, ocorre o desenvolvimento de um outro estágio do ciclo de vida de *T. gondii*: a formação de cistos teciduais contendo bradizoítas. Os cistos teciduais permanecem intracelulares, crescem (seu tamanho varia de 5 a 70 μm), podem conter centenas

de bradizoítas e são estágios infectantes para hospedeiros intermediários e definitivos. Embora possam desenvolver-se em qualquer órgão visceral, incluindo pulmões, fígado e baço, há uma maior prevalência em tecidos neurais e musculares, como cérebro, olhos e musculatura esquelética estriada ou cardíaca. Cistos teciduais intactos são, provavelmente, inofensivos e podem persistir durante toda a vida do hospedeiro (KASPER & BOOTHROYD, 1993; DUBEY, 2004). Os bradizoítas (bradys = lento em grego) são morfologicamente semelhantes aos taquizoítas, multiplicam-se lentamente no interior de cistos teciduais intracelulares e aí podem permanecer sem prejudicar o hospedeiro, a não ser em pacientes imunocomprometidos, nos quais poderia ocorrer a recrudescente da infecção (MONTROYA & LIENSEFELD, 2004).

3.2.4. Invasão de células hospedeiras por *T. gondii*

O processo de invasão ocorre em cinco fases principais: (1) reconhecimento célula-célula; (2) adesão entre as células; (3) penetração no interior da célula hospedeira; (4) secreção de antígenos pelo protozoário e (5) modificações na membrana do vacúolo parasitóforo (MINEO & KASPER, 1994).

T. gondii, potencialmente, é capaz de parasitar qualquer célula nucleada através de um mecanismo dinâmico, o qual é distinto do mecanismo de entrada de outros microorganismos intracelulares (CARRUTHERS, 2002; DENKERS & BUTCHER, 2005). A maioria dos vírus e bactérias intracelulares necessita da participação da célula hospedeira (via pinocítica ou fagocítica) ao contrário de *T. gondii* que penetra, ativamente, na célula hospedeira utilizando seu citoesqueleto (CARRUTHERS, 2002). Sugere-se, então, que a invasão de células hospedeiras por *T. gondii* seja um processo, dependente não só da capacidade motora do parasita, mas também de seu metabolismo energético. Esta habilidade motora

envolve movimentos espiralares do corpo celular e o rearranjo dos microtúbulos que rodeiam o conóide que, após o contato físico com a célula hospedeira, se expande em direção à membrana da mesma (BONHOMME et al., 1992; OLIVEIRA-LIMA et al., 2001).

Além da influência dos elementos estruturais do citoesqueleto de *T. gondii* são necessárias organelas secretórias como micronemas, roptrias e grânulos densos durante o processo de invasão às células hospedeiras (BLACK & BOOTHROYD, 2000). Tais organelas desencadeiam uma seqüência de eventos, precisamente orquestrados, durante a invasão que inicia-se com uma descarga de proteínas derivadas das micronemas na superfície da célula hospedeira. Micronemas, localizadas na região apical do parasita, são as primeiras organelas a descarregar suas proteínas, desempenhando um papel na adesão do parasita à célula hospedeira. Das três organelas citadas anteriormente as micronemas são as mais conservadas no grupo dos seres Apicomplexa, o que implica na idéia de que esta seja a mais importante organela durante a invasão da célula hospedeira. O conteúdo das roptrias é, subsequente, liberado no citoplasma da célula hospedeira e participa da biogênese do vacúolo parasitóforo. Finalmente, o conteúdo dos grânulos densos é descarregado e as proteínas liberadas associam-se com a membrana do vacúolo parasitóforo e envolvem-se na aquisição de nutrientes da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; DENKERS & BUTCHER, 2005).

Durante a invasão que dura, aproximadamente, de 20 a 30 segundos a membrana plasmática da célula hospedeira se invagina formando um vacúolo que envolve o parasita (DENKERS & BUTCHER, 2005).

Proteínas de superfície celular da célula hospedeira com exceção daquela na qual o parasita está ancorado, a glicosilfosfatidilinositol (GPI), são excluídas da formação do vacúolo (DENKERS & BUTCHER, 2005). Sendo assim, a membrana do vacúolo parasitóforo, uma bicamada fosfolipídica, não apresenta marcadores de membrana plasmática da célula hospedeira (JOINER & DUBREMETZ, 1993). Em outras palavras, o vacúolo formado utiliza-se de moléculas que governam o reconhecimento pela maquinaria da célula hospedeira

e como resultado mantém um pH neutro e permanece segregado das vias endocíticas e exocíticas da célula hospedeira (KIMATA & TANABE, 1987; WERK, 1989; PFEFFERKORN, 1990; FURTADO et al., 1992; DENKERS & BUTCHER, 2005). A proteína de superfície P30 presente na membrana do vacúolo parasitóforo, logo após a invasão por *T. gondii*, sugere que produtos do parasita possam migrar para a membrana do vacúolo, tornando-a uma membrana híbrida (KIMATA & TANABE, 1987).

3.2.5. Vias de infecção e epidemiologia

T. gondii é um protozoário abundante na natureza (DUBEY et al., 1997), possui distribuição cosmopolita e se desenvolve nos mais diversos tipos celulares nucleados de diferentes espécies. Estima-se que até 5×10^8 pessoas estejam infectadas por *T. gondii* (WERK, 1989; DUBEY, 2004; DENKERS & GAZZINELLI, 1998).

T. gondii pode ser transmitido através de transfusão sangüínea, transmissão dérmica (a partir de lesões), ingestão de alimentos contaminados, transmissão congênita ou transplacentária ou através de algum acidente laboratorial. Humanos ou outros animais podem infectar-se, principalmente, através da via oral ingerindo oocistos presentes em água ou vegetais ou ingerindo cistos teciduais encontrados em carne crua ou mal passada. Humanos podem ainda adquirir toxoplasmose através de cães domésticos que tiveram contato com fezes de gatos. Os felídeos infectam-se geralmente através da ingestão de oocistos liberados por outros felídeos ou de cistos encontrados na carne de outros animais (WONG & REMINGTON, 1993; DUBEY, 2004). Segundo Aliberti (2005) a principal via de transmissão é a predação, ou seja, gatos que alimentam-se de camundongos infectados. Sendo assim, percebe-se que *T. gondii* adaptou suas diferentes fases do ciclo biológico podendo infectar hospedeiros com

diferentes comportamentos alimentares: para infectar herbívoros há o ciclo oral-oocisto e para carnívoros há o ciclo oral-cisto tecidual (WONG & REMINGTON, 1993; DUBEY, 2004).

Gatos domésticos são provavelmente a principal fonte de contaminação ambiental, pois liberam grande quantidade de oocistos, permitindo assim a continuidade do ciclo biológico de *T. gondii*. Oocistos quando esporulados sobrevivem por longos períodos em condições ambientais adequadas, como em solo úmido, no qual podem sobreviver de meses a anos. Podem ainda suportar longos períodos em outros locais como em frutas e vegetais. Oocistos no solo podem ser dispersos mecanicamente por moscas, baratas, besouros e minhocas (DUBEY, 2004).

3.2.6. Toxoplasmose e a resposta imunológica contra *T. gondii*

A toxoplasmose é usualmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, entretanto em fetos ou em indivíduos imunocomprometidos, como transplantados, HIV (vírus da imunodeficiência adquirida) positivos ou apresentando algum tipo de tumor, a toxoplasmose pode resultar em lesões debilitantes e até mesmo letais. Nestes, a infecção pode ser reativada a partir do rompimento de cistos teciduais, disseminação de bradizoítas e conversão em taquizoítas (WONG & REMINGTON, 1993; DUBEY, 2004).

A gravidade da toxoplasmose congênita depende do período da gravidez no qual a mãe se infectou. Pode consistir apenas de uma leve deficiência visual no feto, levar ao desenvolvimento da Tétrade de Sabin (retinocoroidite, hidro ou microcefalia, convulsões, calcificações cerebrais e retardamento mental) ou em casos mais extremos ao aborto (FERRO et al., 2002).

A toxoplasmose adquirida após o nascimento pode desenvolver diferentes manifestações clínicas. Linfadenopatias são as formas clínicas mais comuns

observadas em humanos, acompanhadas de sintomas como febre, fadiga, dor muscular, inflamação na garganta, dor de cabeça e mal-estar. Embora tais sintomas de fase aguda apresentem um quadro benigno, o diagnóstico nesta fase é vital em mulheres grávidas, por causa do risco oferecido ao feto. A toxoplasmose ocular e encefálica desencadeiam manifestações clínicas mais graves, especialmente, em pacientes imunocomprometidos. A toxoplasmose é uma das principais causas de morte em indivíduos aidéticos (DUBEY, 2004).

O estudo da patogênese da infecção por *T. gondii* deve considerar diversos fatores que podem influenciar o padrão de resposta imune do hospedeiro frente ao parasita. Sabe-se, por exemplo, que o sexo e a idade podem ser decisivos no estabelecimento de um determinado tipo de resposta imune (KITTAAS & HENRY, 1980; WALKER et al., 1997; PORTELA et al., 2004). A linhagem do camundongo e a sua bagagem genética também podem conferir ou não resistência ao parasita. Brown e colaboradores (1994) verificaram que camundongos BALB/c têm menores quantidades de cistos cerebrais e menor desenvolvimento de encefalite em relação a 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 à produção de citocinas como: IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 (GAZZINELLI et al., 1991; HUNTER et al., 1995; MacDONALD & MONTELEONE, 2001). IL-12 e IFN- γ estimulam a produção de óxido nítrico, fundamental na eliminação do parasita (KERSTEN et al., 1997). Buzoni-Gaetel e colaboradores (2001) observaram uma superprodução de IFN- γ e síntese de óxido nítrico mediando a inflamação de camundongos C57BL/6 após infecção oral por *T. gondii*. IFN- γ tem papel crucial na resistência contra a toxoplasmose e pode ser produzido por linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD4⁺ e células NK em resposta a presença de IL-12, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SHER et al., 1993; GAZZINELLI et al., 1994). Presume-se que IFN- γ participe da morte celular de *T. gondii*, através de dois mecanismos: indução da produção de óxido nítrico ou a depleção de nutrientes importantes para a sua sobrevivência

(como o triptofano) por tipos celulares parasitados ou não (PFEFFERKORN et al., 1986).

Após a infecção de células do epitélio intestinal a sobrevivência do parasita irá depender do seu deslocamento para outros órgãos do hospedeiro, em particular, para o tecido neural, ocular e/ ou muscular. Para facilitar seu deslocamento o parasita pode encontrar um "meio de transporte" como monócitos. Estes, quando circulantes, podem ser infectados e o parasita dentro deles, opsonizado ou não, é hábil para sobreviver e se deslocar (FADUL et al., 1995). A dificuldade de detecção de parasitas no sangue, exceto por técnicas sensíveis como PCR (reação em cadeia da polimerase), 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).

Experimentos utilizando camundongos C57BL/6 infectados com a cepa cistogênica ME-49 demonstraram que TNF- α pode ser importante na prevenção de encefalites causadas por *T. gondii*. Sendo que a depleção de TNF- α pode induzir um aumento da mortalidade em camundongos durante a fase aguda da toxoplasmose, mesmo que a cepa utilizada, experimentalmente, seja pouco virulenta. O tratamento com anticorpos anti- TNF- α e anti- IFN- γ leva à redução de óxido nítrico no cérebro e à exacerbação da encefalite (GAZZINELLI et al., 1993b; GRAU et al., 1992).

Macrófagos infectados por *T. gondii* sintetizam mais IL-12 *in vivo* e, conseqüentemente, esta citocina induz o aumento, proporcional, dos níveis de RNAm que codificam IFN- γ . A neutralização de IFN- γ ou de IL-12 inibe a expressão de moléculas do MHC de classe II, resultando na diminuição da resposta celular e no aumento da infecção e do crescimento do número de parasitas em macrófagos peritoneais de camundongos *in vivo* (GAZZINELLI et al., 1994).

O papel da IL-12 foi estudado também em modelos murinos imunocompetentes e imunossuprimidos, comparativamente, e observou-se que a

administração dessa citocina a estes grupos infectados por *T. gondii*, aumenta a sobrevivência de ambos de maneira significativa. Entretanto, tal proteção é anulada quando os camundongos sofrem depleção de IFN- γ , TNF- α ou células NK. A neutralização de IL-12 resulta em 100% de mortalidade em camundongos infectados (GAZZINELLI et al., 1994; HUNTER et al., 1995) inclusive com a cepa ME-49, sugerindo que o parasita induz a produção de IL-12 como mecanismo de proteção para hospedeiro, garantindo desta forma a sobrevivência do mesmo e, conseqüentemente, o seu habitat (HUNTER et al., 1995).

A adaptação para a sobrevivência intracelular de *T. cruzi*, *T. gondii* e *Leishmania* sp conta com mecanismos envolvidos com a via de sinalização intracelular e cada parasita influencia, diferentemente, tal transdução de sinais pró-inflamatórios. A infecção por *T. gondii* tem sido associada com uma defesa forte e protetora do hospedeiro, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, que podem até desencadear processos patológicos. Algumas hipóteses levam a crer que *T. gondii* direciona vias de sinalização pró-inflamatórias, induzindo a produção de mediadores solúveis pelo hospedeiro. Citocinas como IL-12 e TNF- α são prontamente encontradas no soro de camundongos infectados por *T. gondii*, durante a fase aguda. Além disso, experimentos *in vitro* com macrófagos, estimulados com tioglicolato, revelam a supressão da produção de TNF- α e IL-12 em células infectadas por taquizoítas. A síntese de IL-12 é, eventualmente, iniciada contudo a de TNF- α permanece bloqueada. Similarmente, a expressão de antígenos pelo MHC classe II e a produção de óxido nítrico são suprimidos em macrófagos infectados por *T. gondii*. Esse fenômeno pode representar um mecanismo de defesa do parasita, com o objetivo de desviar a atividade microbicida ou a indução da imunidade mediada por linfócitos T. Outro mecanismo de defesa é representado pela habilidade de *T. gondii* em bloquear a translocação de NF- κ B, a qual está implicada com a via de ativação de respostas pró-inflamatórias de macrófagos, incluindo a indução da produção de TNF- α , IL-12 e óxido nítrico, o que resulta em um agravamento da infecção. Interessantemente, a ativação de STAT1 induzida por IFN- γ é também defeituosa em células parasitadas, um evento de

sinalização inicial que leva a uma expressão aumentada de MHC classe II. Esses resultados levam a crer na possibilidade de *T. gondii* agir contra componentes pró-inflamatórios da cascata de sinalização intracelular. Um outro mecanismo de evasão de *T. gondii* é a sua habilidade em induzir a resistência a apoptose de células infectadas, o que garante ao parasita a prevenção do desenvolvimento da morte celular programada da célula hospedeira, possibilitando a sua sobrevivência e, conseqüentemente, a sua disseminação (DENKERS & BUTCHER, 2005).

A habilidade de sobrevivência de *T. gondii* pode ser crítica, dependendo de sua capacidade em induzir uma potente imunidade celular. Linfócitos T CD4⁺ Th1 e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos são vitais no desenvolvimento de uma imunidade protetora, capaz de permitir a sobrevivência do hospedeiro durante as fases aguda e crônica da infecção. As propriedades protetoras, de linfócitos T CD4⁺ Th1 e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, devem-se as suas habilidades em produzir IFN- γ e citocinas pró-inflamatórias, conhecidas como as principais mediadoras da resistência contra *T. gondii*. Camundongos geneticamente deficientes, que não expressam IFN- γ , não sobrevivem à fase aguda da infecção, enquanto que a neutralização dessa citocina, mediada por anticorpos, durante a infecção crônica por *T. gondii*, demonstra que a produção continuada de IFN- γ e a presença de óxido nítrico são necessárias para a sobrevivência do hospedeiro. Outros mediadores químicos, com atividade antimicrobiana, como os reativos intermediários do nitrogênio, podem interferir na atuação de enzimas metabólicas chave: indoleamina 2, 3 dioxigenase (mediador química capaz de induzir a degradação do triptofano) e a família de proteínas ligadas ao GTP (DENKERS et al., 2004).

Türck e colaboradores (2005) demonstraram que há um outro importante mecanismo efector contra *T. gondii* e o grupo B de *Streptococcus*, que é a produção da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) capaz de degradar o triptofano. A produção de tal enzima está envolvida com a imunoregulação e defesa antimicrobiana de astrócitos, células capazes ainda de produzir citocinas, apresentar antígenos via MHC classe II e estimular linfócitos T pré-ativados de

uma maneira MHC classe II restrita. Além disso, IFN- γ produzido por esta célula permite-lhe restringir o crescimento de vários patógenos capazes de causar encefalites e meningites. A produção da IDO ocorre em astrócitos após o estímulo do IFN- γ , que é o seu principal ativador. TNF- α também é capaz de aumentar a atividade da IDO, enquanto que IL-4 e IL-10 são inibem a atividade da IDO, mesmo em células estimuladas por IFN- γ , como macrófagos humanos. A IDO participa de várias reações imunológicas celulares como a regulação da ativação de linfócitos T e é um importante mecanismo efetor contra parasitas, bactérias e vírus. Ainda neste contexto, Silva e colaboradores (2002) observaram em camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* o aumento da expressão da IDO, a diminuição dos níveis de triptofano e o aumento nos níveis de kinurenina, que é um produto direto do catabolismo do triptofano.

Dados clínicos e epidemiológicos têm levado à investigação da ação de inibidores de proteases (PI) contra fungos e protozoários. Esta investigação demonstrou que alguns PIs de HIV têm um efeito direto na virulência da cepa RH de *T. gondii* *in vitro*. Nos últimos estágios da infecção pelo HIV ocorre o desenvolvimento de encefalite toxoplásmica que surge, especialmente, em indivíduos com baixo número de linfócitos T CD4⁺ (<100 células/ μ l de sangue). O curso clínico e epidemiológico da infecção pelo HIV, tem alterado e exibido evidências de que inibidores de protease (PI) não apenas restauram a imunidade mediada por células, pois também podem inibir a ação de proteases derivadas de patógenos. Por exemplo, duas PIs (ritonavir e saquinavir) podem influenciar respostas imunológicas e vias celulares como: ativação da apresentação e do processamento de antígenos e a liberação de citocinas inflamatórias e de quimiocinas por células mononucleares do sangue periférico e por células endoteliais (POZIO & MORALES, 2005).

O processo inflamatório desencadeado por *T. gondii* revela, também, a participação de receptores Toll-like (TLR), especialmente, TLR-2 (MUN et al., 2003). Receptores Toll-like de mamíferos, homólogos a receptores Toll de insetos, são importantes durante as respostas da imunidade inata e da adaptativa. O sistema Toll e o sistema complemento auxiliam na ativação da imunidade

adaptativa (FLAJNIK & DU PASQUIER, 2004). Relatou-se que macrófagos deficientes de TLR-2 são incapazes de produzir IL-12 e óxido nítrico, em resposta a infecção (KASPER et al., 2004).

3.2.7. Cepas de *T. 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, que por sua vez será resistente ou susceptível (BOHNE et al., 1993).

Howe e Sibley (1995) determinaram a estrutura genética populacional de *T. gondii* e demonstraram a existência de três tipos clonais predominantes: tipo I, II e III. Cepas do tipo I estão relacionadas à toxoplasmose humana congênita e à virulência aguda em camundongos, cepas do tipo II relacionam-se aos casos de reativação da infecção crônica em humanos e as cepas do tipo III estão associadas 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 (HOWE & SIBLEY, 1995). A possibilidade de que o genótipo do parasita influencie a gravidade da doença em humanos, é suportada por diferenças na virulência, observada em modelos animais experimentais. Cepas tipos II e III de *T. gondii* guiam o desenvolvimento de uma infecção crônica e produzem cistos teciduais em camundongos, nos quais as cepas tipo I são extremamente virulentas, produzindo altos níveis de parasitemia, com um aumento do risco de transmissão transplacentária e da gravidade da infecção em fetos. Diferentes cepas do parasita podem estar muito bem adaptadas aos diferentes hospedeiros intermediários. Dubey e colaboradores (2003) reportaram que camundongos inoculados com cepas de *T. gondii*, inclusive do tipo III, coletadas de cérebros de cães (com sorologia positiva para

T. gondii e que foram a óbito em menos de 20 dias) são capazes de matar camundongos. Estes resultados estão de acordo com estudos de cepas tipo III de *T. gondii*, virulentas para camundongos, coletadas de aves em diferentes regiões geográficas do Brasil. Classificar as diferentes cepas de *T. gondii* é extremamente importante para a caracterização epidemiológica, pois permitirá a investigação da distribuição e da virulência de diferentes cepas de parasitas isoladas de populações animais e humanas (SILVA et al., 2005).

A cepa RH vem sendo intensamente utilizada como padrão na comparação entre cepas. A cepa RH foi isolada em 1939 de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmica (HOWE & SIBLEY, 1995). 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 10^5 taquizoítas desta cepa seria suficiente para matar em 6-7 dias camundongos BALB/c (FUJII et al., 1983).

A cepa ME-49 foi originalmente isolada da musculatura de carneiro. É uma cepa cistogênica e considerada avirulenta ou de baixa virulência (LUNDE & JACOBS, 1983). Em camundongos BALB/c a cepa ME-49 de *T. gondii* 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).

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).

3.3. Interação entre mastócitos e *T. gondii*

Mastócitos de ratos Sprague-Dawley foram investigados após interação com taquizoítas de *T. gondii*, da cepa RH, isolados de camundongos BALB/c e alterações marcantes foram observadas. Após contato *in vitro* os taquizoítas apresentaram-se aderidos às microvilosidades dos mastócitos, e estes apresentaram canais intracitoplasmáticos e grânulos com conteúdo exibindo elétron-densidade moderada e conteúdo de grânulos no meio extracelular. *T. gondii* exibiu alterações morfológicas induzidas pela presença do mastócito como rompimento de membrana, formação de vacúolos intracelulares e destruição de organelas (HENDERSON & CHI, 1998). Koeppel e colaboradores (1998) relataram um caso de meningoencefalite toxoplásmica em um paciente que possuía mastocitose gastrintestinal e cutânea. Os roedores *Calomys callosus* infectados com 10^2 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* apresentaram aumento no número de mastócitos da região ocular, quando comparados a roedores não infectados, além de um infiltrado de células inflamatórias. A interação entre mastócitos e taquizoítas de *T. gondii* resultou em um aumento de até 75% na concentração de mastócitos, especialmente, na conjuntiva, e na presença de mastócitos em processo de desgranulação. Tais autores sugerem que mastócitos apresentam um importante papel na resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro após infecção por *T. gondii* (GIL et al., 2002). Esta afirmativa está de acordo com outro estudo realizado em mastócitos do exsudato peritoneal de *C. callosus*, que apresentaram-se em processo de desgranulação após infecção com 10^5 taquizoítas de *T. gondii*. Este último estudo revelou que ocorre aumento do número de mastócitos no exsudato peritoneal de *C. callosus* após 12 horas de infecção e diminuição após 48 horas. Tal diminuição foi atribuída, provavelmente, à liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos. A liberação deste conteúdo induziu um influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais infectados (FERREIRA et al., 2004). O influxo de neutrófilos pode ser atribuído à presença de CXCR2, já que este não ocorre em

camundongos deficientes de CXCR2 infectados pela cepa VEG de *T. gondii* (DEL RIO et al., 2001). Mastócitos de órgãos como linfonodos e intestino delgado, especialmente o íleo, apresentaram características morfológicas que assemelham-se a mastócitos em processo induzido de desgranulação pelo composto 48/80, sugerindo a participação dos mastócitos na resposta imune contra *T. gondii*, também nestes órgãos (FERREIRA et al., 2004).

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Utilizou-se camundongos BALB/c e C57BL/6 machos adultos, com, no mínimo, 12 semanas, pesando de 20 a 30 gramas, mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram mantidos em ciclos diários de 12 horas com iluminação e doze horas sem iluminação a temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ e com dieta de água e ração *ad libitum* para ratos e camundongos Nuvilab CR1 (Nuvital).

4.2. Parasitas e infecção

4.2.1 Manutenção da cepa RH de *T. gondii* e sua inoculação em camundongos BALB/c e C57BL/6

Para infecção dos animais, utilizou-se a cepa RH de *T. gondii*, mantida através de inoculações intraperitoneais em camundongos Swiss, seguindo-se um critério de 48 a 72 horas de intervalo (CAMARGO et al., 1978; MINEO et al., 1980), no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

Os exsudatos peritoneais foram colhidos através da lavagem com 4 ml de PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH 7,2) estéril. Exsudatos peritoneais com menor grau de contaminação (bactérias, hemácias ou outros tipos celulares) e maior quantidade de parasitas foram selecionados para repique e utilizados nos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

No presente trabalho, os taquizoítas colhidos do exsudato peritoneal de Swiss infectados com a cepa RH de *T. gondii*, foram corados com o corante vital azul de tripan e contados em câmara de Neubauer. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram inoculados, intraperitonealmente, com um inóculo único de 10^5 taquizoítas viáveis de *T. gondii* em 400 µl de PBS. O controle da infecção dos camundongos inoculados por *T. gondii* foi feito através da análise do exsudato peritoneal e aqueles não infectados (ausência de taquizoítas no exsudato peritoneal) foram desprezados. Os camundongos controle foram inoculados intraperitonealmente, sob as mesmas condições dos animais experimentais, apenas com o veículo: 400 µl de PBS.

Todos os camundongos, experimentais ou controle, utilizados foram sacrificados após 24 e 48 horas de infecção por deslocamento cervical para coleta de seus exsudatos peritoneais. O exsudato peritoneal colhido quando se apresentava hemorrágico era desprezado. Os exsudatos peritoneais selecionados foram submetidos à análise à microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão ou as células presentes nos mesmos foram contadas em câmara de Neubauer.

4.2.2. Manutenção da cepa ME-49 de *T. gondii* e sua inoculação em camundongos BALB/c e C57BL/6

Para infecção dos animais, utilizou-se a cepa ME-49 de *T. gondii*, mantida através de inoculações via oral de cistos teciduais em camundongos C57BL/6 no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

Os camundongos C57BL/6 foram inoculados por via oral, aproximadamente, 2 meses antes do sacrifício com 10 cistos de *T. gondii* da cepa ME-49. Após o sacrifício com deslocamento cervical coletou-se o cérebro que foi macerado em PBS até tornar-se uma solução homogênea. Desta retirou-se 20 µl que foram depositados em lâmina para microscopia, cobertos com lamínula e o número de cistos de *T. gondii* contados (FUX et al., 2003). Estes cistos foram utilizados para inóculo em outros camundongos C57BL/6 para manutenção da cepa ME-49 e nos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

Os camundongos destinados aos experimentos, BALB/c e C57BL/6, foram inoculados oralmente com 20 cistos teciduais da cepa ME-49 de *T. gondii*, em 400 µl de PBS. Camundongos controle foram inoculados oralmente, sob as mesmas condições dos animais experimentais, apenas com o veículo: 200 µl de PBS.

Todos os camundongos, experimentais ou controle, utilizados foram sacrificados após 8 dias de inóculo com deslocamento cervical e tiveram seus órgãos coletados: fígado, cérebro e intestino delgado para análise à microscopia de luz, histopatológica e/ ou imunohistoquímica.

4.3. Microscopia de luz

Para a análise morfológica dos mastócitos do exsudato peritoneal, de camundongos controle, BALB/c e C57BL/6, e de camundongos submetidos a infecção com 10^5 taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH, após 24 e 48 horas, as cavidades peritoneais foram lavadas com PBS e os exsudatos peritoneais coletados. Foram utilizados 3 animais de cada linhagem para cada tempo e/ ou experimento desenvolvido. Após a colheita, os exsudatos peritoneais foram centrifugados a 500 g durante 10 minutos a 37° C. Seus sobrenadantes foram desprezados e as suspensões celulares foram ressuspensas em 10 ml de solução fixadora: solução de Carnoy (etanol absoluto: clorofórmio: ácido acético- 6: 3: 1) durante 1 hora. Após a fixação, as células foram lavadas e submetidas a um novo ciclo de centrifugação a 500 g durante 10 minutos a 37° C. Em seguida, seus sobrenadantes foram desprezados e as suspensões celulares foram ressuspensas em 1 ml de PBS, centrifugadas a 500 g durante 10 minutos a 37° C, ressuspensas em Ágar Noble 3% (Laboratórios Difco Ltda).

Para a análise morfológica, imunohistoquímica e histopatológica os seguintes órgãos foram coletados: fígado, cérebro e intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* ou 8 dias de inóculo com o veículo. O intestino delgado foi coletado em toda a sua extensão e segmentado em quatro porções: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Estas foram lavadas com PBS e enroladas, cuidadosamente, em finos palitos de madeira formando um “rolo suíço” (FUX et al., 2003). Foram fixados em solução de Carnoy (etanol absoluto: clorofórmio: ácido acético- 6: 3: 1) durante 24 horas a 4° C e desidratados.

A desidratação, tanto das células do exsudato peritoneal quanto dos órgãos coletados, foi desenvolvida em três ciclos, de 30 minutos cada, utilizando-se etanol absoluto. Em seguida, o material foi incluído em resina

plástica a base de glicol metacrilato (Tecknovit 7.100 - KULZER) ou em Paraplast[®] (Paraplast[®] Tissue Embedding Medium (Oxford[®] Labware-Division of Sherwood Medical St. Louis, Mo., U.S.A.).

Para evitar a análise do mesmo mastócito utilizou-se cortes de 2 μ m de espessura do material incluído em glicol metacrilato, semi-seriados com intervalos mínimos de 30 μ m, através de navalha de vidro. Os cortes foram distendidos em água destilada gelada, depositados em lâminas histológicas e mantidos à temperatura ambiente para 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 da Universidade Federal de Uberlândia.

Para evitar a recontagem do mesmo mastócito utilizou-se cortes de 4 μ m de espessura do material incluído em Paraplast[®], semi-seriados com intervalos mínimos de 30 μ m, através de navalhas descartáveis para microtomia. Os cortes foram distendidos em banho-maria histológico à 40° C, coletados e depositados em lâminas histológicas e mantidos em estufa à 60° C, com os objetivos de aumentar a aderência do corte à lâmina e eliminar o excesso de parafina. Em seguida, os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados com diferentes corantes: hematoxilina de Harris durante 15 minutos e eosina durante 15 segundos, para análise histopatológica, ou azul de Toluidina 0,1 % em tampão fosfato citrato pH 3,0 durante 3 minutos para análise morfológica ou contagem dos mastócitos. Além disso, os cortes foram submetidos a outros procedimentos técnicos para análise imunohistoquímica, como será descrito no item 4.8.

4.4. Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise ultra-estrutural dos mastócitos do exsudato peritoneal, de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção com 10^5 taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH ou inóculo com PBS as cavidades peritoneais foram lavadas com PBS e os exsudatos peritoneais coletados. Foram utilizados 3 animais de cada linhagem para cada tempo e/ ou experimento desenvolvido. Após a colheita, os exsudatos peritoneais foram centrifugados a 500 g durante 10 minutos a 37° C, seus sobrenadantes foram desprezados e as suspensões celulares foram ressuspensas em 10 ml de solução fixadora: solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5 % e paraformaldeído a 2 %) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (cacodylic acid sodium salt trihydrate purum P.A.- Fluka) em pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965) durante 24 horas a 4° C. Após fixação as células foram lavadas e submetidas a um novo ciclo de centrifugação a 500 g durante 10 minutos a 37° C. Em seguida, seus sobrenadantes foram desprezados e as suspensões celulares foram ressuspensas em 1 ml de tampão cacodilato de sódio 0,1 M, centrifugadas a 500 g durante 10 minutos a 37° C e ressuspensas em Ágar Noble 3 % (Laboratórios Difco Ltda). Em seguida, as suspensões celulares foram pós-fixadas 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 0,1 M com ferrocianeto de potássio a 1,5 % por 1 hora à temperatura ambiente, lavadas em tampão cacodilato de sódio e desidratadas 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 etapa 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, os exsudatos peritoneais foram incluídos devidamente orientados e mantidos em estufa a 60° C por 24 horas, no mínimo, para polimerização da resina e conseqüente endurecimento.

Os blocos com o material incluído foram aparados e preparados para microtomia na máquina de talhar (Reichert-Jung). Cortes semi-finos de 0,5 µm 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 se selecionar a melhor área para ultra-microtomia.

Para os estudos ultra-estruturais, os cortes ultra-finos foram submetidos à dupla contrastação 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.

4.5. Contagem do número de mastócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6

Procedeu-se a contagem em células do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção com 10⁵

taquizoítas de *T. gondii* ou inóculo com PBS (utilizou-se no mínimo 3 animais de cada linhagem para cada tempo e/ ou experimento desenvolvido). As células foram centrifugadas a 500 g durante 10 minutos a 37° C, seus sobrenadantes foram desprezados, as suspensões celulares foram ressuspendidas em 1 ml de PBS e coradas com azul de Toluidina O a 1 % e borato de sódio a 1 %. As células foram contadas em câmara de Neubauer, que recebeu 10 µl das suspensões coradas, e seus campos diagonais foram analisados com correção 10^4 , a análise foi feita com a objetiva 40x. As células foram contadas e registradas com o auxílio de um contador manual. No mínimo quatro contagens foram feitas de cada exsudato peritoneal coletado.

4.6. Contagem do número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6

Para a contagem do número de mastócitos presentes nas diferentes porções do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* ou inóculo com PBS (utilizou-se no mínimo 3 animais de cada linhagem para cada tempo e/ ou experimento desenvolvido), estes foram fixados, incluídos, cortados e corados com azul de Toluidina 0,1 % em tampão fosfato citrato pH 3,0 durante 3 minutos, como descrito anteriormente no item 4.3. Para a contagem dos mastócitos utilizou-se 4 cortes de cada porção do intestino delgado, em toda a sua extensão, de animais infectados ou controle, com auxílio da objetiva de 40x.

4.7. Análise histopatológica

Para a análise histopatológica das diferentes porções do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* ou 8 dias de inóculo com PBS (utilizou-se no mínimo 3 animais de cada linhagem para cada tempo e/ ou experimento desenvolvido), estas foram fixadas, incluídas, cortadas e coradas com hematoxilina de Harris durante 15 minutos e eosina durante 15 segundos, como descrito anteriormente no item 4.3.

4.8. Imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica dos órgãos estudados: fígado, intestino delgado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* ou 8 dias de inóculo com o veículo (utilizou-se no mínimo 3 animais de cada linhagem para cada tempo e/ ou experimento desenvolvido), estes foram fixados, incluídos e cortados como descrito anteriormente no item 4.3. Em seguida, os cortes foram submetidos ao seguinte protocolo: (i) foram incubados, duas vezes durante 20 minutos cada, a temperatura ambiente com ácido acético 5 % para bloqueio da fosfatase alcalina endógena; (ii) foram tratados com 2 % do soro de cabra normal diluído em PBS com Tris 0,05 M, pH 7,4 (TBS) durante 40 minutos a 37° C para bloqueio de ligações em sítios não-específicos; (iii) foram incubados com soro de coelho anti-*T. gondii*, durante 12 horas a 4° C. Para os controles negativos os anticorpos primários foram suprimidos e utilizou-se soro normal de coelho; (iv) em seguida, os cortes foram lavados

com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-Imunoglobulina G (IgG) de coelho biotinilado produzido em cabra (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) durante 30 minutos a 37° C; (v) o sinal da reação foi amplificado utilizando-se o sistema ABC (Biomeda, Foster City, Calif.), desenvolvido com “fast red-naphthol” (Sigma Chemical Co.) e contra corado com hematoxilina de Mayer’s (FERRO et al., 2002).

4.9. Estudo quantitativo do parasitismo

O parasitismo foi analisado no fígado, em um hemisfério cerebral e em toda a extensão do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* ou 8 dias de inóculo com PBS (utilizou-se no mínimo 3 animais de cada linhagem para cada tempo e/ ou experimento desenvolvido). Os órgãos foram fixados, incluídos, cortados e submetidos aos procedimentos técnicos para imunohistoquímica, como descrito anteriormente no item 4.6. Os cortes foram cuidadosamente analisados e o número de campos parasitados foram contados, independentemente do número de parasitas em cada. Avaliaram-se no mínimo quatro cortes de cada porção do intestino delgado (em toda a sua extensão), de cada hemisfério cerebral e de, aproximadamente, metade do fígado de cada camundongo, utilizando-se a objetiva de 40x.

4.10. Contagem do número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c tratados com o composto 48/80

Para a realização destes experimentos quatro grupos de camundongos foram utilizados, com no máximo 3 animais em cada. (1º grupo) controle negativo, inóculo com o veículo, PBS; (2º grupo) controle positivo, inóculo com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; (3º grupo) tratamento com o composto 48/80 e (4º grupo) tratamento com o composto 48/80 e inóculo com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os camundongos tratados com o composto 48/80 receberam duas doses diárias do composto 48/80 em doses crescentes até o quinto dia (1º dia: 0,1 mg/ 100 gramas de peso; 2º dia: 0,2 mg/ 100 gramas de peso; 3º dia: 0,3 mg/ 100 gramas de peso; 4º dia: 0,4 mg/ 100 gramas de peso; 5º dia: 0,5 mg/ 100 gramas de peso); no sexto, oitavo e décimo dia não houve tratamento; enquanto que no sétimo, nono e décimo primeiro dia os camundongos receberam duas doses diárias de 0,5 mg/ 100 gramas de peso; finalmente, no décimo segundo dia foram sacrificados. Os grupos infectados receberam um inóculo com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* no quarto dia de tratamento e foram sacrificados após 8 dias, ou seja, após 12 dias de tratamento.

Após o sacrifício houve a coleta das diferentes porções do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) de camundongos BALB/c que foram processadas para análise à microscopia de luz e coradas com azul de Toluidina, como descrito anteriormente no item 4.3. Para a contagem dos mastócitos utilizou-se 4 cortes de cada porção do intestino delgado, em toda a sua extensão, de cada animal infectado ou controle, com auxílio da objetiva de 40x.

4.11. Análise estatística

Os dados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão (SD). As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas utilizando-se teste *t* não-pareado (GraphPad Prism 3.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Resultados

5- RESULTADOS

5.1. Mastócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*

5.1.1. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão

À microscopia de luz, as células dos exsudatos peritoneais das duas linhagens de camundongos analisadas, BALB/c e C57BL/6, apresentaram características semelhantes, inclusive após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*.

Os mastócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle exibiram, em sua maioria, forma esférica ou ovóide e grânulos citoplasmáticos, também em sua maioria, esféricos exibindo diâmetros, aparentemente, uniformes que preenchiam quase todo o citoplasma (Figura 1A). Além de mastócitos outros tipos celulares foram encontrados nos exsudatos peritoneais, principalmente, neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Nos exsudatos peritoneais de camundongos, BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*, os mastócitos exibiram forma, em sua maioria, esférica ou ovóide apresentando variada quantidade de grânulos no seu citoplasma. Tais grânulos citoplasmáticos apresentaram diferenças no tamanho, na forma e, às vezes, exibindo conteúdo em imagem negativa (Figuras 1B e 1C). Mastócitos exibindo projeção citoplasmática conferindo-lhes uma forma irregular foram, freqüentemente, observados (Figura 1D).

No interior de mastócitos dos exsudatos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, após 24 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*,

encontrou-se quantidade variável de vacúolos parasitóforos contendo taquizoítas (Figuras 1B, 1C, 1E e 1F). A presença de vacúolos parasitóforos contendo taquizoítas foi observada também em outros tipos celulares do exsudato peritoneal (Figuras 1C, 1E e 1F).

Nos camundongos BALB/c e C57BL/6, após 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*, observou-se que mastócitos e outros tipos celulares com vacúolos parasitóforos foram raramente encontrados (Figura 1G). Taquizoítas, em sua maioria, foram encontrados livres no meio extracelular (Figura 1G).

À microscopia eletrônica de transmissão os mastócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle exibiram, em sua maioria, forma esférica ou ovóide. Seus grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, apresentaram conteúdo homogêneo e elétron-denso preenchendo quase todo o citoplasma e, alguns, alojados em concavidades da membrana nuclear (Figura 2A). Após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*, os mastócitos dos exsudatos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 nitidamente exibiram menor quantidade de grânulos no seu citoplasma. Estes grânulos citoplasmáticos apresentaram, aparentemente, diferenças no tamanho; na forma; na elétron-densidade do conteúdo que apresentou-se moderada, elétron-densa ou elétron-lúcida, e no seu aspecto, que apresentou-se homogêneo ou grumoso (Figuras 2B e 2C). Observaram-se ainda grânulos citoplasmáticos fundidos ou em processo de fusão formando canais intracitoplasmáticos (Figura 2E), grânulos citoplasmáticos com halo perigranular elétron-lúcida (Figura 2E). Mastócitos exibindo vacúolos parasitóforos no seu interior, com variado número de taquizoítas em diferentes estágios do processo de endodiogenia, foram também observados (Figuras 2B e 2C). Próximos à membrana do vacúolo parasitóforo, destes mastócitos, observaram-se grânulos citoplasmáticos apresentando conteúdo grumoso e rompimento da membrana perigranular com liberação deste conteúdo, tanto para o interior do vacúolo parasitóforo, quanto para o meio extracelular (Figuras 2B e 2C).

Mastócitos em íntima associação com diferentes tipos celulares (Figura 2B), aparentemente, leucócitos e macrófagos foram observados. Tais tipos

celulares também apresentaram vacúolos parasitóforos no seu interior (Figura 2B).

Após 48 horas de infecção notou-se o predomínio de taquizoítas livres no meio extracelular (Figura 2D). Nos mastócitos observou-se nítido aumento de organelas membranosas: retículo endoplasmático granular, complexo de Golgi e mitocôndrias (Figura 2E).

5.1.2. Valores absolutos do número de mastócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos presentes no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*

A análise do exsudato peritoneal revelou que em camundongos BALB/c ocorre um influxo de mastócitos, após 24 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*, ao comparar-se com o grupo controle, animais inoculados apenas com o veículo: PBS. Este influxo não foi observado após 48 horas de infecção (Gráfico 1).

Em camundongos da linhagem C57BL/6 não há diferença estatística no número de mastócitos da cavidade peritoneal entre camundongos não infectados e infectados, tanto após 24 horas quanto após 48 horas de inóculo com PBS ou com taquizoítas, respectivamente (Gráfico 1).

O número de mastócitos encontrados na cavidade peritoneal de camundongos controle BALB/c após 24 horas não apresentou diferença estatística quando comparado ao número de mastócitos encontrados na cavidade peritoneal de camundongos controle C57BL/6 após 24 horas, ou seja, sob as mesmas condições experimentais não há diferença no número de mastócitos entre as duas linhagens. Resultados semelhantes foram observados, após comparação do número de mastócitos do exsudato peritoneal entre as duas linhagens, sob

outras condições experimentais: após 48 horas de inóculo com PBS, 24 horas e 48 horas pós-infecção pela cepa RH de *T. gondii* (Gráfico 1).

Observou-se ainda que o número de neutrófilos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c apresentou um aumento após 24 horas de infecção em relação ao número de neutrófilos encontrados no grupo controle após 24 horas de inóculo com o veículo. Porém, o número de neutrófilos diminuiu, significativamente, após 48 horas de infecção por *T. gondii* quando comparado com o número de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal após 24 horas de infecção (Gráfico 2).

Em camundongos C57BL/6 após 24 horas de infecção por *T. gondii* o número de neutrófilos não variou quando comparado ao número de neutrófilos encontrados em camundongos controle após 24 horas de inóculo com o veículo. Semelhantemente, após 48 horas, não houve diferença entre o número de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal de camundongos infectados e o número de neutrófilos encontrados em animais não infectados (Gráfico 2).

O número de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal de camundongos controle BALB/c ou C57BL/6 após 24 horas foi semelhante ao número de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal de camundongos controle BALB/c ou C57BL/6 após 48 horas. Ao compararem-se as duas linhagens notou-se que não há diferença estatística no número de neutrófilos em nenhum dos grupos após as diferentes condições experimentais (Gráfico 2).

O número de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c apresentou um aumento significativo após 24 horas de infecção em relação ao número de macrófagos encontrados no grupo controle após 24 horas de inóculo com o veículo. O número de macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c controle, após 24 horas, também foi maior do que o número de macrófagos encontrados no grupo dos camundongos BALB/c controle, sacrificados após 48 horas. O número de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c não variou após 48 horas de infecção em relação ao número de macrófagos encontrados no grupo controle após 48 horas de inóculo com o veículo (Gráfico 3).

Em camundongos da linhagem C57BL/6 não há diferença estatística no número de macrófagos da cavidade peritoneal entre camundongos não infectados e infectados após 24 e/ ou 48 horas de inóculo, com PBS ou com taquizoítas, respectivamente. Ainda, em camundongos C57BL/6, o número de macrófagos do exsudato peritoneal após 48 horas de inóculo com o veículo foi maior do que o número de macrófagos encontrados no grupo dos animais inoculados com o veículo e sacrificados após 24 horas (Gráfico 3).

Camundongos BALB/c e C57BL/6 quando comparados em relação ao número de macrófagos apresentaram diferença após 24 horas de inóculo com o veículo, ou seja, em camundongos controle C57BL/6 observou-se um maior número de macrófagos do exsudato peritoneal do que em camundongos controle BALB/c. Esta diferença foi a única observada entre as duas linhagens (Gráfico 3).

Em camundongos BALB/c o número de linfócitos do exsudato peritoneal foi, estatisticamente, significativo quando se compararam diferentes grupos e condições experimentais: o número de linfócitos foi maior no grupo de animais 24 horas pós-infecção do que no grupo de animais controle 24 horas pós-inóculo com PBS; o número de linfócitos foi maior também no grupo de animais controle 48 horas pós-inóculo com PBS do que no grupo de animais controle 24 horas pós-inóculo com PBS; e ainda observou-se que o número de linfócitos foi maior no grupo de animais 48 horas pós-infecção do que no grupo de animais 24 horas pós-infecção (Gráfico 4).

Em camundongos da linhagem C57BL/6 não há diferença significativa entre o número de linfócitos da cavidade peritoneal de camundongos 48 horas pós-inóculo com PBS com o grupo de animais sacrificados após 48 horas de infecção por *T. gondii*. O número de linfócitos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 apresentou um aumento significativo após 48 horas de inóculo com o veículo em relação ao número de linfócitos encontrados no grupo controle após 24 horas de inóculo com o mesmo veículo (Gráfico 4).

Após comparação entre as duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, observou-se que a diferença do número de linfócitos foi significativa

após 24 e 48 horas de inóculo com PBS no exsudato peritoneal de camundongos C57BL/6 (Gráfico 4).

5.2. Mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*

5.2.1. Microscopia de luz

A análise morfológica das diferentes regiões do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle revelou que os mastócitos foram encontrados, preferencialmente, na submucosa (Figura 5A) e na camada muscular. Estes exibiram, em sua maioria, forma ovóide e grânulos citoplasmáticos esféricos, também em sua maioria, e com diâmetros, aparentemente, uniformes preenchendo quase todo o citoplasma (Figura 5B). Mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* também foram encontrados, predominantemente, na submucosa e na camada muscular. Tais células ostentavam, em sua maioria, forma ovóide e variada quantidade de grânulos citoplasmáticos (Figura 5C). Estes apresentaram diferenças nítidas no tamanho, na intensidade da metacromasia (Figura 5D) e alguns grânulos exibiram imagem negativa.

5.2.2. Valores absolutos do número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*

A análise estatística e comparativa, à microscopia de luz, do número de mastócitos do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 mostrou que este foi notadamente maior em camundongos BALB/c. A superioridade do número de mastócitos em camundongos da linhagem BALB/c foi evidente tanto em animais não-infectados quanto em animais infectados. Os mastócitos foram ainda, preferencialmente, encontrados no duodeno de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não-infectados (Gráfico 5).

5.2.3. Análise histopatológica do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii*

Alterações histopatológicas não foram observadas nas camadas que compõem o intestino delgado, em toda a sua extensão, em camundongos BALB/c e C57BL/6 não infectados (Figuras 7A e 7C).

O intestino delgado dos camundongos BALB/c apresentaram um discreto infiltrado inflamatório na lâmina própria e submucosa no duodeno, jejuno proximal e distal. No íleo dos animais foi observado um infiltrado inflamatório moderado em alguns locais, alargamento das vilosidades e, aparentemente, diminuição de células caliciformes (Figura 7B). Os animais C57BL/6 apresentaram uma reação inflamatória moderada no duodeno e no jejuno, já no íleo foi observada uma infiltração inflamatória intensa em alguns locais, alargamento e encurtamento de algumas vilosidades (Figura 7D). De modo geral

os animais C57BL/6 apresentaram uma reação inflamatória mais grave quando comparados com os animais BALB/c.

5.2.4. Análise imunohistoquímica do intestino delgado, fígado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 8 dias de infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii*

A análise imunohistoquímica revelou a presença de *T. gondii* nos diferentes órgãos estudados: intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo), fígado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6. No fígado (Figura 8A) e no cérebro (Figura 8B) a presença de *T. gondii* foi notada, indistintamente, por todo o órgão. No intestino delgado, independentemente, da sua porção os taquizoítas foram encontrados, em sua maioria, na mucosa e submucosa (Figuras 8C e 8D).

Após análise imunohistoquímica do intestino delgado de camundongos BALB/c após 8 dias de infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii* observou-se que o número de campos parasitados foi, estatisticamente, predominante no duodeno quando comparado com o número de campos parasitados presentes no jejuno proximal, no jejuno distal e no íleo. Estes últimos não apresentaram diferença estatística no número de campos parasitados quando comparados entre si. Em camundongos C57BL/6 após 8 dias de infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii* notou-se, após análise imunohistoquímica, que o número de campos parasitados foi maior no jejuno proximal do que no jejuno distal. Nenhuma outra comparação entre as regiões analisadas (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) apresentou diferença significativa no número de campos parasitados (Gráfico 6).

O número de campos parasitados foi analisado, ainda, de forma comparativa entre as duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, e diferenças significantes foram observadas no jejuno proximal, jejuno distal e

íleo. Estas regiões apresentaram uma quantidade superior de campos parasitados em camundongos C57BL/6 do que em camundongos BALB/c. Tal supremacia do número de campos parasitados não foi observada no duodeno, no cérebro e no fígado (Gráfico 6).

5.3. Análise do intestino delgado, cérebro e fígado de camundongos BALB/c após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e tratados com o composto 48/80 durante 12 dias

5.3.1. Valores absolutos do número total de mastócitos do intestino delgado

À microscopia de luz utilizando-se a objetiva de 40x, observou-se que o número de mastócitos encontrados no intestino delgado dos camundongos do *grupo 1* (animais sacrificados após 8 dias de inóculo com salina) concentrou-se, principalmente, nos primeiros segmentos do mesmo, ou seja, o número de mastócitos encontrados no duodeno foi maior do que o número de mastócitos encontrados no jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Assim como, o número de mastócitos encontrados no jejuno proximal foi maior do que o número de mastócitos encontrados no jejuno distal e no íleo. Todavia o número de mastócitos encontrados no jejuno distal e no íleo não variou, quando comparados entre si.

Nos camundongos do *grupo 2* (animais sacrificados após 12 dias de tratamento com o composto 48/80) o número de mastócitos encontrados no intestino delgado foi maior no duodeno do que no jejuno proximal, jejuno distal e no íleo. Tal superioridade também foi observada no jejuno proximal destes

animais em relação ao jejuno distal. Porém, o número de mastócitos encontrados no jejuno proximal e no jejuno distal não variou em relação ao número de mastócitos encontrados no íleo.

Semelhantemente, o número de mastócitos encontrados no intestino delgado dos camundongos do *grupo 3* (animais sacrificados após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e 12 dias de tratamento com o composto 48/80) foi maior no duodeno do que no jejuno proximal, jejuno distal e no íleo. Contudo ao comparar-se o número de mastócitos encontrados no jejuno proximal com o número de mastócitos encontrados no jejuno distal e no íleo nenhuma alteração significativa foi observada nestes animais. Assim como, nenhuma diferença foi notada entre o número de mastócitos encontrados no jejuno distal com o número de mastócitos encontrados no íleo.

No intestino delgado dos animais do *grupo 4* (animais sacrificados após 8 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*) o número de mastócitos encontrados no duodeno não variou em relação ao número de mastócitos encontrados no jejuno proximal. Entretanto, o número de mastócitos encontrados no duodeno ou no jejuno proximal foi maior do que o número de mastócitos encontrados no jejuno distal e no íleo. Nenhuma diferença foi observada entre o número de mastócitos encontrados no jejuno distal com o número de mastócitos encontrados no íleo.

Ao se compararem os segmentos do intestino delgado entre si dos camundongos pertencentes aos quatro grupos o número de mastócitos não apresentou qualquer alteração estatística significativa (Gráfico 7).

5.3.2. Análise imunohistoquímica de campos parasitados no intestino delgado, cérebro e fígado de camundongos BALB/c

O número de campos parasitados foi analisado em camundongos BALB/c infectados durante 8 dias com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e tratados durante 12 dias com o composto 48/80 (Gráfico 8).

Nos animais apenas infectados o número de campos parasitados foi, significativamente, maior no duodeno do que no jejuno proximal e distal. No grupo dos animais infectados e tratados com o composto 48/80 o número de campos parasitados também se sobressaiu no duodeno em relação ao jejuno proximal e ao íleo (Gráfico 8).

O número de campos parasitados foi nitidamente inferior em quase todos os segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno distal e íleo) de camundongos apenas infectados em relação a camundongos infectados e tratados com o composto 48/80. O predomínio de campos parasitados em camundongos apenas infectados em relação a camundongos infectados e tratados com o composto 48/80 não foi observado no cérebro e no fígado (Gráfico 8).

Documentação

PRANCHA 1

Figura A. Fotomicrografia de mastócito colhido do exsudato peritoneal de camundongo BALB/c controle, após 24 horas de inóculo com PBS. Material incluído em metacrilato. Azul de Toluidina. Cortes de 3 μm .

Figuras B a G. Fotomicrografias de mastócitos colhidos dos exsudatos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*. Material incluído em metacrilato. Azul de Toluidina. Cortes de 3 μm .

FIGURA A. Mastócito (seta) com forma esférica exibindo grânulos citoplasmáticos, aparentemente, esféricos e de tamanhos aproximados preenchendo quase todo o citoplasma. 550 X.

FIGURA B. Exsudato peritoneal de camundongo BALB/c após 24 horas de infecção. Mastócito (seta) contendo grânulos citoplasmáticos exibindo, nitidamente, diferentes tamanhos e formas (cabeças de setas) e vacúolo parasitóforo (cabeças de setas duplas) no seu interior. 550 X.

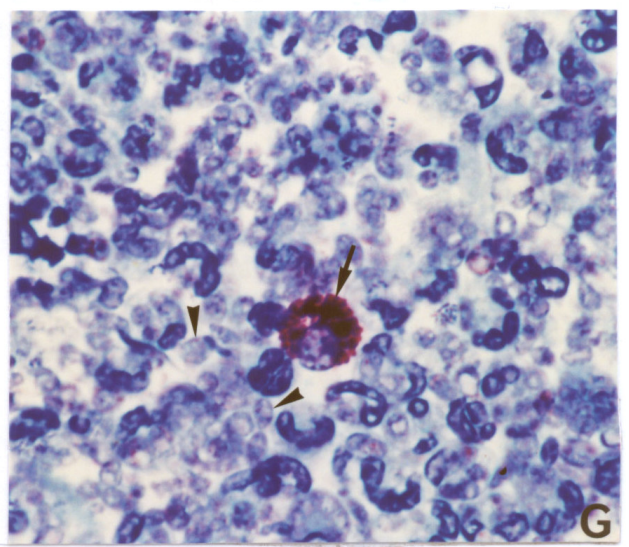
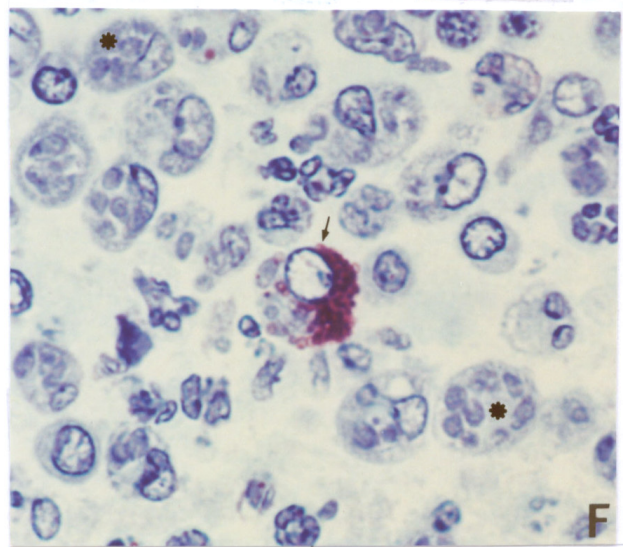
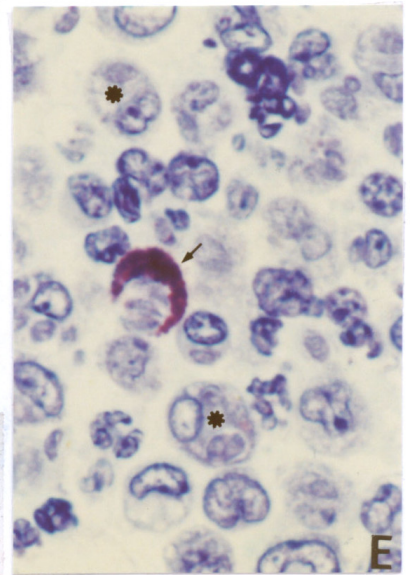
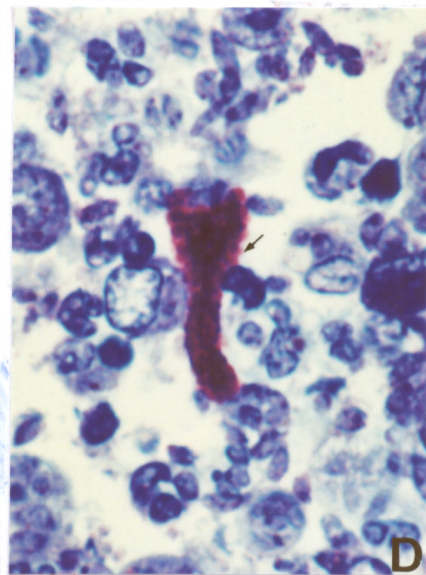
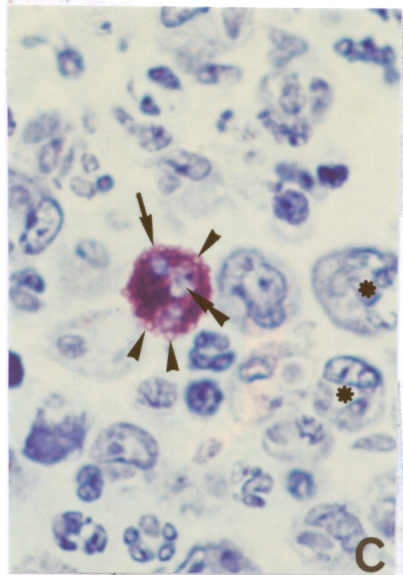
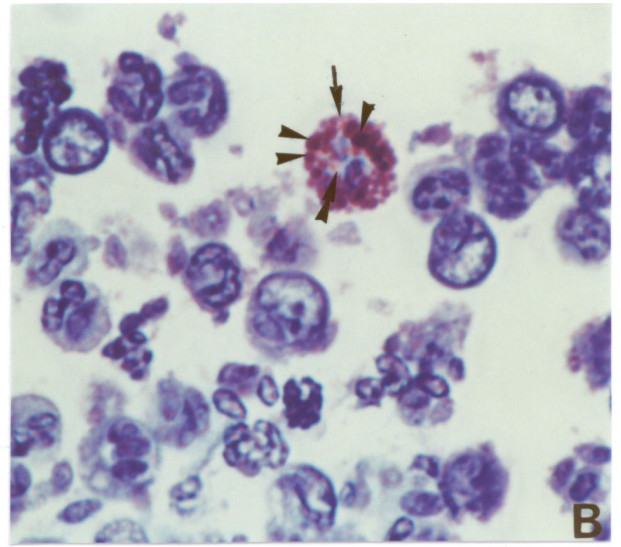
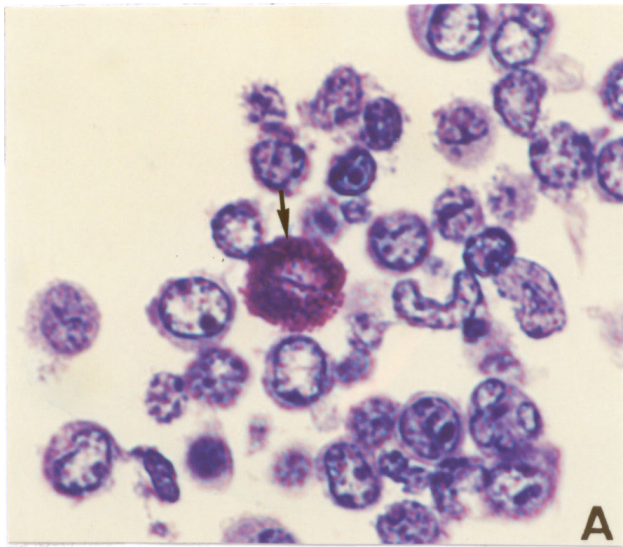
FIGURA C. Exsudato peritoneal de camundongo C57BL/6 após 24 horas de infecção. Mastócito (seta) com grânulos citoplasmáticos, exibindo conteúdo em imagem negativa (cabeças de setas), e vacúolo parasitóforo (cabeças de setas duplas) no seu interior. Observar que outras células (asteriscos) do exsudato peritoneal contém vacúolo parasitóforo. 450 X.

FIGURA D. Exsudato peritoneal de camundongo BALB/c após 24 horas de infecção. Mastócito exibindo projeção citoplasmática (seta), conferindo-lhe forma irregular. 550 X.

FIGURA E. Exsudato peritoneal de camundongo C57BL/6 após 24 horas de infecção. Mastócito (seta) e outras células (asterisco) do exsudato peritoneal apresentando vacúolo parasitóforo. 450 X.

FIGURA F. Exsudato peritoneal de camundongo C57BL/6 após 24 horas de infecção. Mastócito (seta) e outras células do exsudato peritoneal apresentando vacúolo parasitóforo (asteriscos). 450 X.

FIGURA G. Exsudato peritoneal de camundongo BALB/c após 48 horas de infecção. Mastócito (seta). Taquizoítas livres (cabeças de setas) no meio extracelular. 450 X.



PRANCHA 2

FIGURA A. Eletromicrografia de mastócito colhido do exsudato peritoneal de camundongo C57BL/6 controle, após 24 horas de inóculo com PBS.

FIGURAS B a E. Eletromicrografias dos exsudatos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c, após 24 e 48 horas de infecção pela cepa RH de *T. gondii*.

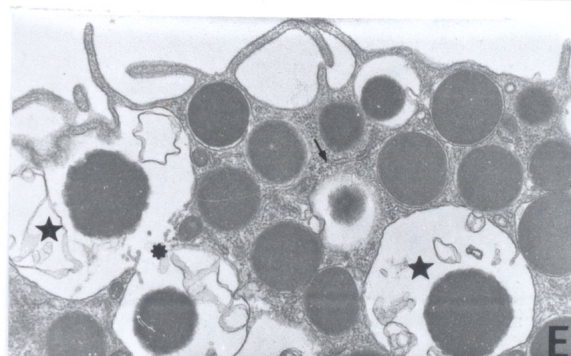
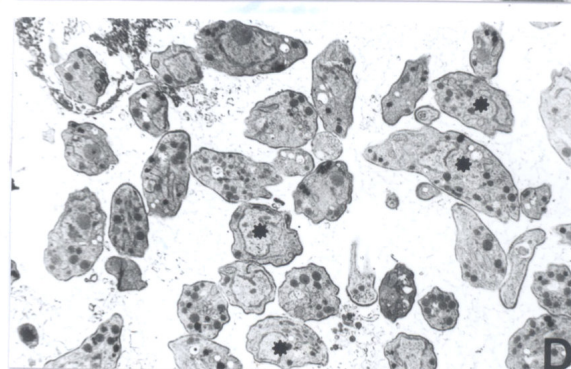
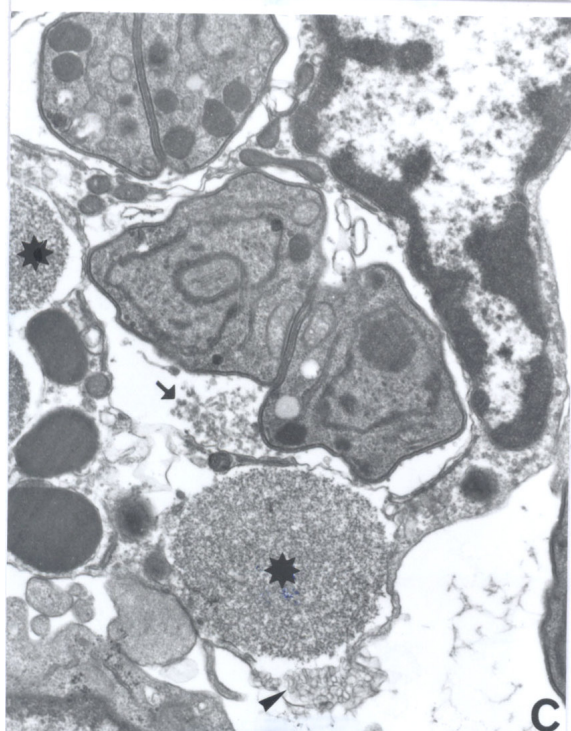
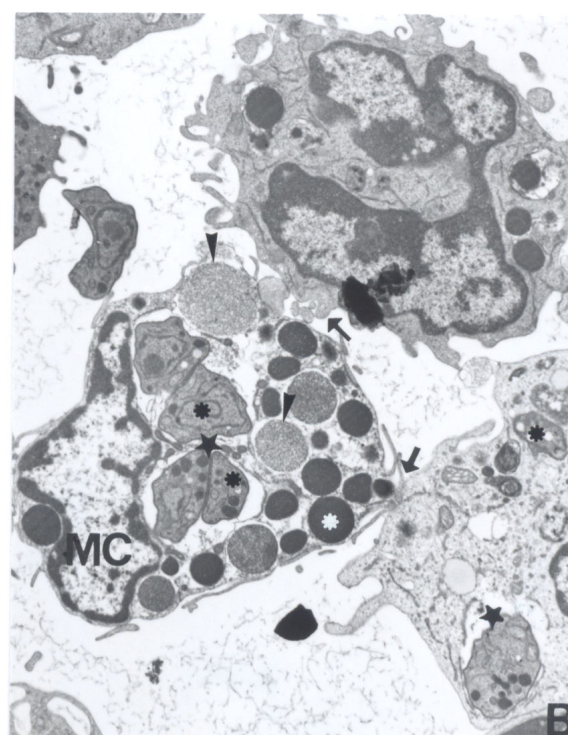
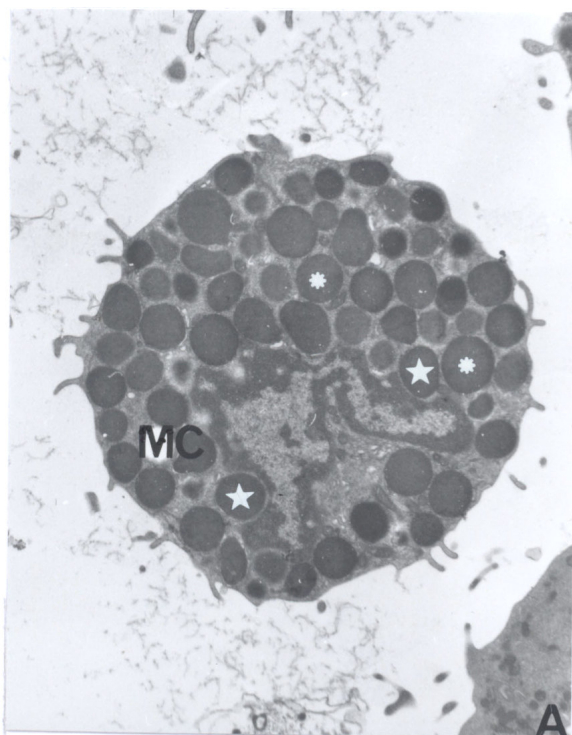
FIGURA A. Mastócito (MC) com forma esférica exibindo grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, apresentando conteúdo homogêneo e elétron-denso (asteriscos) preenchendo quase todo o citoplasma e, alguns, alojados em concavidades da membrana nuclear (estrelas). 9 600 X.

FIGURA B. Camundongo C57BL/6 após 24 horas de infecção. Mostra mastócito (MC) em associação com diferentes tipos celulares (setas) e apresentando poucos grânulos citoplasmáticos de conteúdo elétron-denso (asterisco branco) ou grumoso (cabeças de setas). Presença de vacúolo parasitóforo no interior do mastócito e de outras células (estrelas) do exsudato peritoneal. Taquizoítas em diferentes estágios do processo de endodiogenia (asteriscos negros). 6 000 X.

FIGURA C. Camundongo C57BL/6 após 24 horas de infecção. Detalhe do mastócito exibido na Figura B. Observar a presença de grânulos citoplasmáticos apresentando conteúdo grumoso (asteriscos) e rompimento da membrana perigranular com liberação deste conteúdo, aparentemente, tanto para o interior do vacúolo parasitóforo (seta), quanto para o meio extracelular (cabeça de seta). 16 600 X.

FIGURA D. Camundongo BALB/c após 48 horas de infecção. Taquizoítas livres (asteriscos) no meio extracelular. 4 800 X.

FIGURA E. Camundongo BALB/c após 48 horas de infecção. Nota-se em camundongos BALB/c, após 48 horas de infecção, processo de fusão de grânulos citoplasmáticos indicativo da formação de canais de desgranulação (asterisco); grânulos com halo elétron-lúcido (estrelas); retículo endoplasmático granular (setas). 16 600 X.



PRANCHA 3

GRÁFICO 1. Média dos valores absolutos do número total de mastócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle (após 24 e 48 horas de inóculo com o veículo- PBS) ou infectados (durante 24 e 48 horas com 10^5 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*). Número de mastócitos $\times 10^4$ por mililitro. * $P=0,0440$.

GRÁFICO 2. Média dos valores absolutos do número total de neutrófilos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle (após 24 e 48 horas de inóculo com o veículo- PBS) ou infectados (durante 24 e 48 horas com 10^5 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*). Número de neutrófilos $\times 10^4$ por mililitro. * $P=0,0150$. ** $P=0,0309$.

GRÁFICO 1

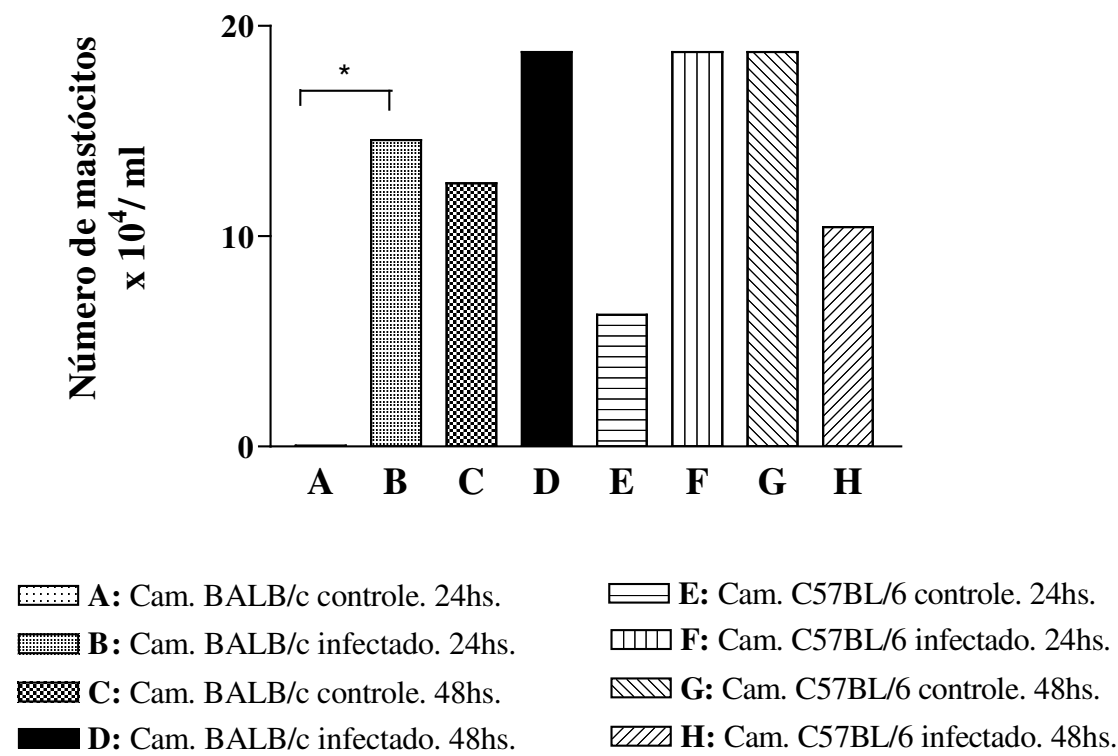
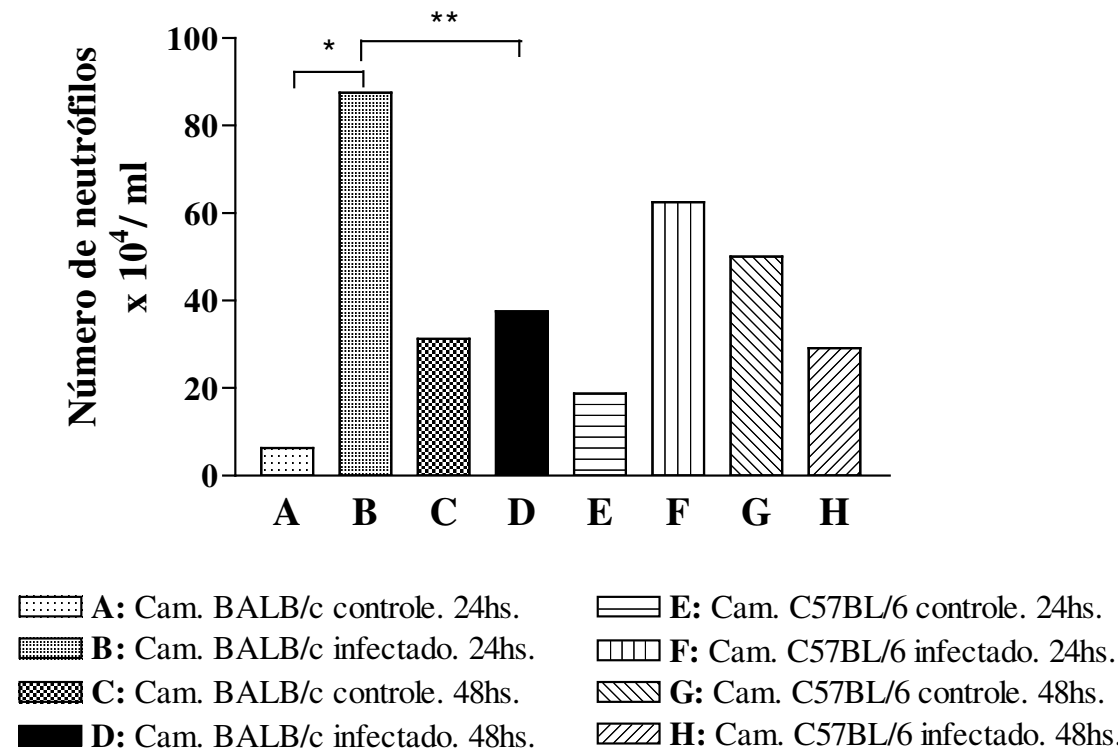


GRÁFICO 2



PRANCHA 4

GRÁFICO 3. Média dos valores absolutos do número total de macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle (após 24 e 48 horas de inóculo com o veículo- PBS) ou infectados (durante 24 e 48 horas com 10^5 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*). Número de macrófagos $\times 10^4$ por mililitro. * $P= 0,0016$. ** $P= 0,0055$. *** $P= 0,0001$. **** $P= 0,0010$.

GRÁFICO 4. Média dos valores absolutos do número total de linfócitos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle (após 24 e 48 horas de inóculo com o veículo- PBS) ou infectados (durante 24 e 48 horas com 10^5 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*). Número de linfócitos $\times 10^4$ por mililitro. * $P= 0,0001$. ** $P= 0,0075$. *** $P= 0,0009$. **** $P= 0,0001$. ***** $P= 0,0001$. ***** $P= 0,0001$.

GRÁFICO 3

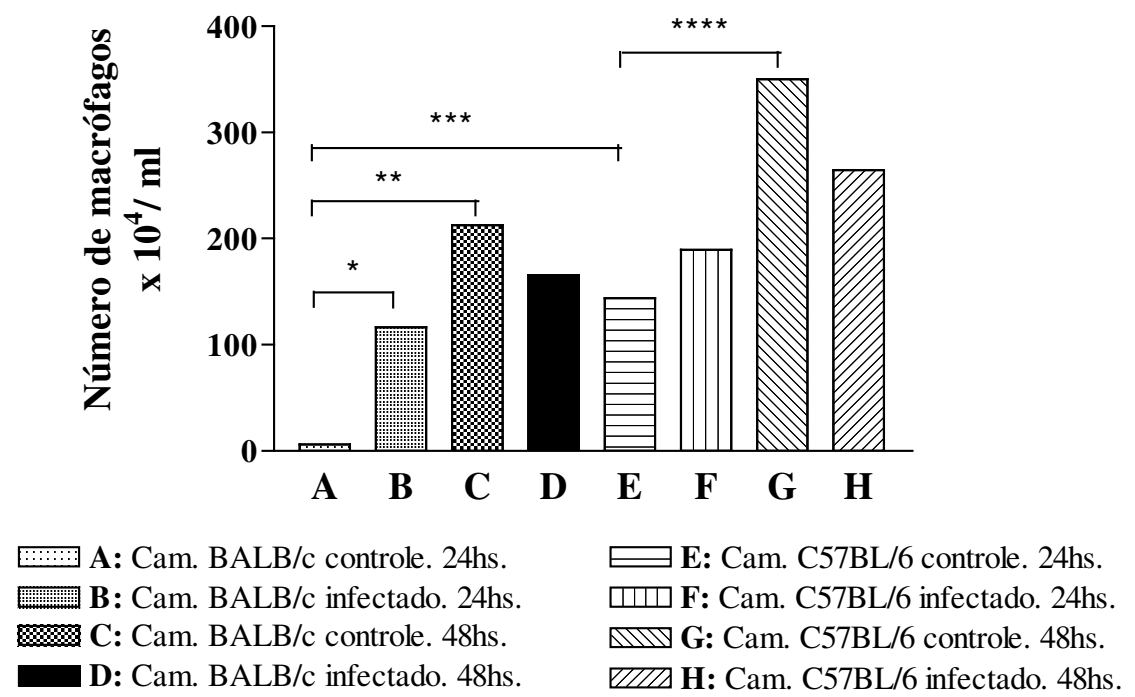
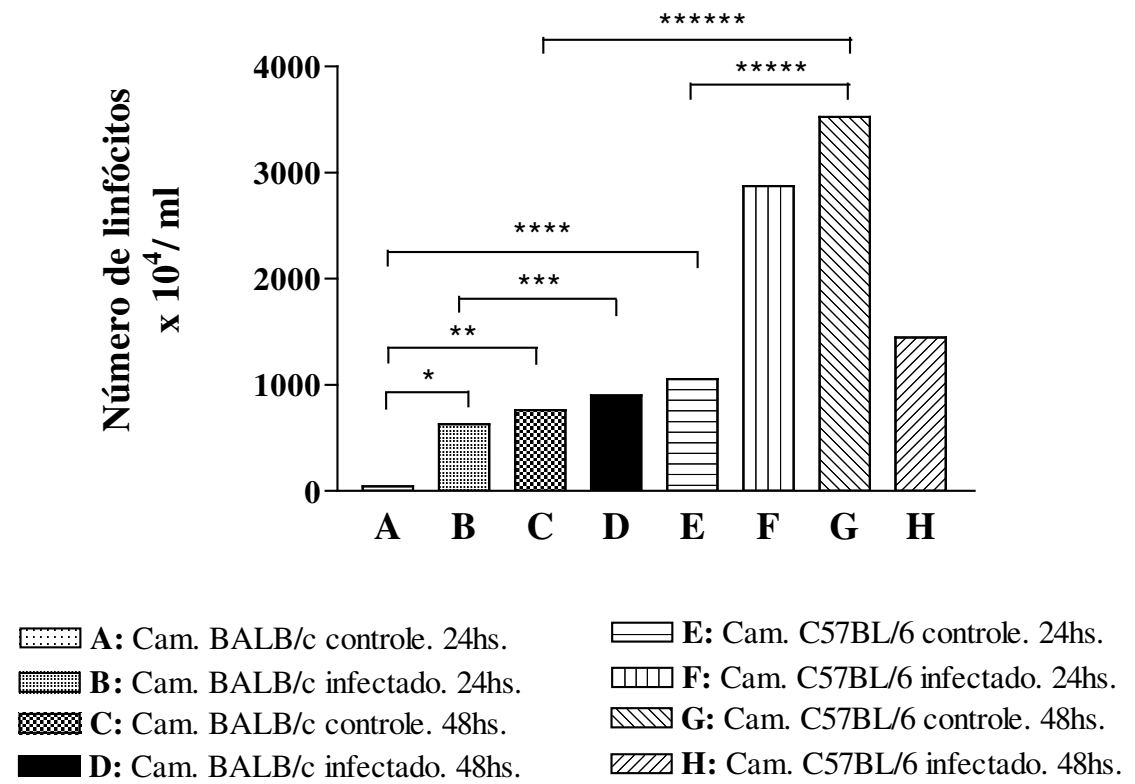


GRÁFICO 4



PRANCHA 5

FIGURAS A e B. Fotomicrografias de mastócitos presentes nas submucosas dos intestinos delgados de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle, após 8 dias de inóculo com PBS, respectivamente. Material incluído em metacrilato. Azul de Toluidina. Cortes de 3 µm.

FIGURAS C e D. Fotomicrografias de mastócitos dos intestinos delgados de camundongos BALB/c e C57BL/6, após 8 dias de infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii*. Material incluído em metacrilato. Azul de Toluidina. Cortes de 3 µm.

FIGURA A. Mastócitos (setas), de camundongo BALB/c, na submucosa exibindo forma ovóide e citoplasma repleto de grânulos. Mucosa (M). Submucosa (SM). Muscular (Mu). 220 X.

FIGURA B. Mastócitos (setas), de camundongo C57BL/6, com forma ovóide. Observar grânulos citoplasmáticos, em sua maioria, esféricos e preenchendo quase todo o citoplasma. Núcleo (asterisco). 550 X.

FIGURA C. Mastócito (seta), na submucosa do intestino delgado de camundongo C57BL/6 infectado, apresentando escassez de grânulos citoplasmáticos. Mucosa (M). Submucosa (SM). Núcleo (estrela). 550 X.

FIGURA D. Mastócitos (setas), de camundongo BALB/c infectado, apresentando grânulos citoplasmáticos (cabeças de setas) exibindo diferenças nítidas no tamanho e na intensidade da metacromasia. 550 X.