

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> e vias de infecção	2
1.2- Manifestações clínicas da Toxoplasmose	5
1.3- Caracterização genotípica das cepas de <i>T. gondii</i>	9
1.4- Resposta imune ao <i>T. gondii</i>	11
1.4.1- Resposta imune inata e celular na toxoplasmose.....	11
1.4.2- Resposta imune humoral na toxoplasmose	16
1.5- Reinfecção pelo <i>T. gondii</i>	18
1.6- Ciclofosfamida: droga imunossupressora	27
1.7- Ciclofosfamida e a infecção pelo <i>T. gondii</i>	29
2- JUSTIFICATIVA	34
3- OBJETIVOS	36
3.1- Objetivo geral	36
3.2- Objetivos específicos	36
4- MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1- Parasitos	37
4.2- Camundongos.....	39
4.3- Infecção primária dos camundongos	39
4.4- Imunossupressão com a ciclofosfamida	40
4.5- Desafio de camundongos BALB/c com as cepas CH3 e EGS.....	41
4.5.1- Desafio de camundongos BALB/c após a infecção primária com a cepa D8.....	41
4.5.2- Desafio de camundongos BALB/c após a infecção primária com a cepa ME49.....	44
4.5.3- Delineamento experimental da infecção primária, da imunossupressão e do desafio dos camundongos BALB/c.....	45
4.6- Bioensaio	46
4.7- Tipagem genética dos re-isolados de <i>T. gondii</i>	47
4.7.1- Extração de DNA	47
4.7.2- PCR-RFLP (Reação em cadeia de polimerase - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição)	47
4.8- ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”).....	49
4.9- Leucograma	50
4.10- Análise Estatística.....	52
5- RESULTADOS	53
5.1- Sobrevivência, número de cistos cerebrais e bioensaio dos camundongos BALB/c imunossuprimidos ou não com Cy e desafiados com as cepas CH3 e EGS	53
5.1.1- Camundongos BALB/c desafiados após a infecção primária com a cepa D8.....	53
5.1.2- Camundongos BALB/c desafiados após a infecção primária com a cepa ME49.....	57

5.2-	Tipagem genética dos re-isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de camundongos BALB/c desafiados com as cepas CH3 e EGS após 45 dias de primo infecção, seguida ou não de imunossupressão com ciclofosfamida (Cy)	61
5.2.1-	Camundongos BALB/c desafiados após a infecção primária com a cepa D8.....	61
5.2.2-	Camundongos BALB/c desafiados após a infecção primária com a cepa ME49.....	64
5.3-	Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> , avaliados pelo método de ELISA, em camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos ou não pela Cy , e desafiados com as cepas CH3 e EGS.....	66
5.3.1-	Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos imunocompetentes desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa D8.....	66
5.3.2-	Anticorpos IgM e IgA em camundongos imunocompetentes desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa D8.....	68
5.3.3-	Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa D8.....	70
5.3.4-	Anticorpos IgM e IgA em camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa D8	72
5.3.5-	Anticorpos IgM e IgA 30 dias após o desafio com as cepas CH3 e EGS em camundongos primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos ou não pela Cy.....	72
5.4-	Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> , avaliados pelo método de ELISA, em camundongos BALB/c primo infectados com a cepa ME49, imunossuprimidos ou não pela Cy , e desafiados com as cepas CH3 e EGS.....	75
5.4.1-	Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos imunocompetentes desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa ME49.....	75
5.4.2-	Anticorpos IgM e IgA em camundongos imunocompetentes desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa ME49.....	77
5.4.3-	Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa ME49	77
5.4.4-	Anticorpos IgM e IgA em camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa ME49.....	80
5.4.5-	Anticorpos IgM e IgA 30 dias após o desafio com a cepa CH3 em camundongos primo infectados com a cepa ME49, imunossuprimidos ou não pela Cy.....	80
5.5-	Leucograma	83
6-	DISCUSSÃO	86
7-	CONCLUSÕES	108
8-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

1- INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório descrito por Splendore em 1908 no Brasil, parasitando coelhos de laboratório e por Nicole & Manceaux, no mesmo ano, em um roedor da espécie *Ctenodactylus gondi*, no Instituto Pasteur da Tunísia (NICOLLE & MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908). Segundo Levine (1980) o *T. gondii* é um protozoário que pertence ao Filo Apicomplexa, a Classe Sporozoea, a Sub-Classe Coccidia, à Ordem Eucoccidiida, à Sub-Ordem Eimeriina, à Família Sarcocystidae e à Sub-Família Toxoplasmatinae.

Esse parasito apresenta uma ampla distribuição mundial e é capaz de infectar animais homeotérmicos (aves e mamíferos), incluindo o homem (DUBEY & BEATTIE, 1988). Apesar de sua ampla distribuição mundial, a prevalência do *T. gondii* na população humana varia entre os diferentes países, entre diferentes áreas geográficas dentro de um país e entre diferentes grupos étnicos vivendo em uma mesma área geográfica (TENTER *et al.*, 2000). Estima-se que nos Estados Unidos e no Reino Unido entre 16 e 40% da população esteja infectada com o *T. gondii*, enquanto na América Central, na América do Sul e no continente Europeu a taxa de infecção estimada é de 50-80% da população (DUBEY & BEATTIE, 1988). No Brasil, a prevalência da infecção pelo *T. gondii* é alta e também apresenta variação, o que está evidenciado por estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do país. Coelho *et al.*, (2003) encontraram 75% dos indivíduos com IgG específica contra *T. gondii* em um grupo de 160 doadores de sangue no Recife. Cavalcante *et al.* (2006) observaram uma prevalência semelhante (73,3%) em 195 pessoas residentes em fazendas no estado de Rondônia. Dias *et al.* (2005) encontraram uma positividade de 59,5% no Paraná em um grupo de 47 trabalhadores de uma fábrica

de salsicha de suíno. Esta prevalência foi semelhante à encontrada por Millar *et al.* (2007) em frigorífico no estado do Paraná. Estes autores observaram uma positividade de 58,6% no grupo de 133 trabalhadores de frigorífico e 51,2% no grupo de 41 pessoas que desempenhavam outras atividades. Bóia *et al.* (2008) observaram que 191 (73.5%) índios lauretê do estado do Amazonas apresentavam anticorpos para *T. gondii* (BÓIA *et al.*, 2008). Mais recentemente, Fernandes *et al.* (2009) encontraram uma soroprevalência de 64,9% da infecção pelo *T. gondii* entre mulheres em idade fértil residentes da Região Metropolitana da cidade de São Paulo.

1.1- Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* e vias de infecção

O *T. gondii* possui três formas evolutivas: taquizoítos, bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e esporozoítos (no interior de oocistos). Tais formas estão intimamente ligadas em um complexo ciclo de vida. O ciclo de vida do *T. gondii* é heteroxeno, sendo que os hospedeiros intermediários são os animais de sangue quente, incluindo o homem, e os hospedeiros definitivos são os membros da família Felidae, como por exemplo, os gatos domésticos (DUBEY, 1986; TENTER *et al.*, 2000). Contudo, os felídeos também podem atuar como hospedeiros intermediários do *T. gondii* (DUBEY & BEATTIE, 1988).

O hospedeiro intermediário pode adquirir a infecção através da ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos ou pela ingestão de oocistos esporulados contendo esporozoítos. Normalmente, os cistos estão presentes em carne crua ou mal passada de animais como suínos, caprinos, ovinos, e representam uma importante fonte de infecção para o ser humano (TENTER *et al.*, 2000). Os

esporozoítos podem ser ingeridos juntamente com água ou alimentos crus, contaminados com oocistos, provenientes de fezes de gatos (DUBEY *et al.*, 1998). Essas vias de infecção são ditas horizontais ou pós-natal, e a infecção neste caso é chamada de toxoplasmose adquirida.

Ao chegar ao intestino do hospedeiro intermediário, a parede dos cistos ou dos oocistos é rompida, ocorrendo, respectivamente, a liberação de bradizoítos ou esporozoítos, que penetram nas células epiteliais e transformam-se em taquizoítos (KASPER *et al.*, 2004). Os taquizoítos se multiplicam rapidamente por repetidas endodiogenias e a célula hospedeira se rompe quando ela não pode mais suportar o crescimento dos taquizoítos (DENKERS & GAZZINELLI, 1998; DUBEY *et al.*, 1998). O parasito é, então, disseminado através do sangue e da linfa atingindo vários órgãos, invadindo vários tipos diferentes de células nucleadas do hospedeiro, sofrendo então novas endodiogenias. Essa fase inicial na qual ocorre uma rápida multiplicação dos taquizoítos caracteriza a fase aguda da doença. Quando a resposta imune do hospedeiro contra o parasito se estabelece, os taquizoítos sofrem diferenciação celular para bradizoítos e iniciam uma segunda fase do desenvolvimento que resulta na formação de cistos teciduais. Dentro dos cistos teciduais, os bradizoítos se multiplicam lentamente por endodiogenia, e essa fase da infecção, que persiste por toda a vida do hospedeiro, caracteriza a fase crônica da toxoplasmose. Esses cistos teciduais são encontrados principalmente em tecido neural e muscular, incluindo sistema nervoso central, olhos, músculo esquelético e cardíaco, contudo também podem ser encontrados nas vísceras (DUBEY, 1986). Apesar de a fase crônica persistir por toda a vida do hospedeiro, os cistos teciduais podem romper-se periodicamente, com invasão de novas células e formação de novos cistos teciduais (DUBEY *et al.*, 1998).

Outra forma do hospedeiro intermediário adquirir a infecção pelo *T. gondii* é pela via congênita. A transmissão congênita ocorre quando a mulher é primo infectada pelo *T. gondii* durante a gravidez, e, portanto, passa pela fase aguda da toxoplasmose. Os taquizoítos podem atravessar a placenta ativamente, infectando o feto, o que pode resultar em conseqüências graves para o mesmo, dependendo do trimestre da gestação (REMINGTON & DESMONTS, 1990; DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Contudo, a mulher imunocompetente que adquiriu a infecção pelo *T. gondii* de 4-6 meses antes da concepção já possui uma imunidade protetora que irá prevenir a transmissão vertical para o feto. A exceção ocorre em mulheres imunocomprometidas ou com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) previamente infectadas pelo *T. gondii*, que podem transmitir o parasito para seus fetos (WECHSLER *et al.*, 1986).

O hospedeiro definitivo pode se infectar pelas três formas evolutivas do parasito: através dos taquizoítos, pela via congênita; através dos bradizoítos, ingerindo cistos teciduais viáveis contidos em um hospedeiro intermediário; ou através dos esporozoítos, ingerindo oocistos esporulados do ambiente (DUBEY, 1986). Nesses animais ocorre a fase coccidiana da infecção, pois neles ocorrem as fases assexuada e sexuada de desenvolvimento do *T. gondii*. Ao chegar ao intestino do felídeo, o parasito invade os enterócitos e sofre merogonia, formando os merozoítos que são liberados após o rompimento da célula hospedeira. Esses merozoítos invadem as células epiteliais adjacentes e iniciam a fase sexuada do ciclo de vida do *T. gondii*, pois sofrem gamogonia formando os gametócitos. Os gametócitos originam os gametas masculinos (microgametas) e os femininos (macrogametas). Os microgametas, que são formas móveis extracelulares, fecundam os macrogametas localizados dentro do enterócito, formando o zigoto que

fica envolto por uma parede resistente sendo chamado de oocisto (DUBEY, 1986). A célula epitelial se rompe e o oocisto não esporulado é liberado para o meio ambiente junto com as fezes do hospedeiro definitivo. Após um a cinco dias de exposição ao ar e à temperatura ambiente ocorre a maturação do oocisto por um processo denominado esporogonia, no qual são formados dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. Esse oocisto esporulado é altamente infectante para os hospedeiros e pode permanecer viável por muitos meses no meio ambiente até ser acidentalmente ingerido por humanos e outros animais (DUBEY, 1986).

Segundo Tenter *et al.* (2000), o ciclo do *T. gondii* é heteroxeno facultativo, pois pode ser indefinidamente mantido pela ingestão de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários, mesmo na ausência do hospedeiro definitivo, e também pela transmissão de oocistos entre os hospedeiros definitivos, mesmo na ausência do hospedeiro intermediário.

1.2- Manifestações clínicas da toxoplasmose

Enquanto a infecção com o *T. gondii* em humanos é comum, a doença clínica ocorre principalmente em grupos de risco, especialmente casos de toxoplasmose congênita e de toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos (TENTER *et al.*, 2000). A maioria dos casos de toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes é assintomática. Eventualmente, alguns sintomas moderados e não específicos podem ser observados, dentre os quais a manifestação clínica mais significativa é a linfadenopatia, associada ou não à febre, fadiga, dor muscular, dor de garganta e de cabeça (HILL & DUBEY, 2002).

As manifestações patológicas para o feto após a transmissão congênita são dependentes do trimestre de gestação na qual a transmissão ocorre, sendo que quanto mais jovem for o feto, mais graves são os efeitos da infecção para o mesmo (REMINGTON & DESMONTS, 1990). A consequência menos grave para o feto pode ser a diminuição da visão, enquanto as consequências mais graves são retinocoroidite, hidrocefalia, convulsão e calcificação cerebral. Em casos mais graves pode ocorrer o aborto (HILL & DUBEY, 2002). A seqüela mais freqüente da toxoplasmose congênita é a doença ocular, em especial a retinocoroidite (REMINGTON & DESMONTS, 1990). A toxoplasmose ocular era considerada como resultado da infecção pré-natal com o *T. gondii*, que se manifestava mais tarde na vida do indivíduo. Contudo, existem agora vários registros de casos nos quais o desenvolvimento da toxoplasmose ocular está confirmadamente associado à infecção adquirida pós-natal. Portanto, a toxoplasmose ocular pode ser resultado de uma infecção pré-natal ou de uma infecção que foi adquirida após o nascimento (TENTER *et al.*, 2000).

Segundo Ferreira & Borges (2002), o *T. gondii* é o protozoário mais freqüente causando infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos. Seqüelas causadas pelo *T. gondii* tem sido observadas em pacientes com imunodeficiências devido a várias causas, como em indivíduos com AIDS ou em indivíduos que estão recebendo drogas imunossupressoras devido a neoplasias, doenças auto-imunes, ou que receberam transplante de órgãos ou medula óssea. No último caso, a doença pode ser resultado do transplante de órgão de um doador infectado pelo *T. gondii* para um receptor suscetível sem infecção prévia pelo parasito, ou resultado da reativação de uma infecção latente no receptor devido ao tratamento imunossupressor (TENTER *et al.*, 2000).

A encefalite induzida pelo *T. gondii* tem sido considerada a principal complicação do sistema nervoso central (SNC) em pacientes com AIDS e nesses indivíduos a prevalência dessa encefalite pode chegar a mais de 40%, representando um problema para a saúde pública (ISRAELSKI & REMINGTON, 1988; LUFT & REMINGTON, 1988). Os indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles com imunidade celular deficiente (como indivíduos infectados pelo HIV), correm os riscos de reativação da infecção crônica e disseminação do parasito. A manifestação clínica da toxoplasmose nesses casos pode variar de uma reativação assintomática até uma doença disseminada. A reativação do *T. gondii* ocorre principalmente no SNC do hospedeiro, provavelmente devido a uma menor imunidade no local (LUFT & REMINGTON, 1988; FERREIRA & BORGES, 2002). A doença normalmente se manifesta como encefalite difusa, meningoencefalite, lesões tumorais, síndromes motoras, distúrbios da consciência, ataques epiléticos, entre outros distúrbios no SNC, causando graves danos ao paciente, podendo levá-lo à morte, principalmente quando o tratamento específico não se inicia precocemente (GELLIN & SOAVE, 1992; LUFT & REMINGTON, 1992; FERREIRA & BORGES, 2002). Depois do SNC, o coração e o pulmão são os órgãos mais frequentemente afetados após a disseminação do parasito (FERREIRA & BORGES, 2002). Segundo Luft & Remington (1992) a infecção de outros órgãos, incluindo pele, pulmão, coração, olho e fígado pode ocorrer independentemente do envolvimento do SNC, e casos de infecção grave do trato gastrointestinal e do pâncreas também podem ocorrer.

Segundo Goyal *et al.* (1989), a reativação da toxoplasmose usualmente ocorre em pacientes imunossuprimidos, como aqueles que receberam transplante de órgãos ou aqueles que estão em tratamento de linfoma, leucemia e outras

neoplasias, ou do lupus eritematoso. Nesses pacientes, a encefalite e a doença disseminada também são manifestações clínicas importantes (GOYAL *et al.*, 1989). Esses pacientes podem apresentar um perfil sorológico alterado, compatível com a reativação da infecção, como aumento nos títulos de IgG anti-*T. gondii*, ou, menos frequentemente, aumento dos títulos de anticorpos de fase aguda, como IgM (FERREIRA & BORGES, 2002). Vários estudos vêm demonstrando que após o tratamento com drogas imunossupressoras como a cortisona, timectomia ou irradiação corpórea total ocorre reativação da infecção crônica (FRENKEL, 1957) e que a imunidade mediada por células exerce um papel importante nesse processo (GOYAL *et al.*, 1989). Frenkel & Taylor (1982) demonstraram que células T e células B são importantes para manter uma imunidade protetora contra a toxoplasmose e sugerem que os anticorpos podem prevenir a disseminação do parasito durante a infecção crônica. Para avaliar o risco potencial de disseminação ou reativação da toxoplasmose após a administração de terapia imunossupressora, Sumyuen *et al.* (1996) estudaram os efeitos de corticóides, azatioprina e ciclosporina no curso da infecção aguda e crônica pelo *T. gondii*. Quando a infecção oral dos camundongos ocorreu dois dias após o início da terapia imunossupressora, houve a persistência de parasitos livres, principalmente nos pulmões desses animais. A administração da terapia imunossupressora em camundongos previamente infectados pelo *T. gondii* resultou em um breve ressurgimento da parasitemia quando o tratamento foi iniciado pouco tempo após a infecção. Os autores concluem que as drogas administradas alteraram o curso natural da infecção.

1.3- Caracterização genotípica das cepas de *T. gondii*

Dentre as diversas técnicas disponíveis para a caracterização molecular, a PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorfism*) tem sido uma importante ferramenta utilizada em diversos estudos para a análise genotípica de isolados de *T. gondii* obtidos do homem e de diversos animais. A caracterização genotípica da população de *T. gondii* por PCR-RFLP revela o predomínio de três linhagens clonais que são designadas como cepas tipo I, II e III (DARDÉ *et al.*, 1992; HOWE & SIBLEY, 1995). Essa tipagem genética, capaz de diferenciar os três principais genótipos de *T. gondii*, baseou-se principalmente em cepas isoladas na Europa e nos Estados Unidos da América, por meio da análise de somente um ou dois *loci*, principalmente *SAG1* e *SAG2*. Porém, atualmente sabe-se que a análise de poucos *loci* pode conduzir a uma classificação inadequada dos isolados (DARDÉ, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006).

As cepas tipo I são consideradas cepas virulentas, pois são letais ao camundongo no estágio agudo da infecção, independente do inóculo. Já as cepas tipos II e III são consideradas avirulentas, pois raramente são fatais para camundongos durante a fase aguda, mas podem causar patologia variável no estágio crônico (HOWE *et al.*, 1996).

A análise de novos isolados, obtidos principalmente na América do Sul, vem demonstrando um padrão genotípico que não condiz com o das três linhagens clonais e, portanto, essas cepas não podem ser classificadas simplesmente como cepas tipo I, II ou III. Essas cepas estão incluídas em duas classes gerais: cepas recombinantes, que possuem genótipos semelhantes aos três tipos predominantes, e cepas exóticas, oriundas de hospedeiros não usuais. Essas cepas tem sido fonte

da maioria das amostras analisadas atualmente (BOOTHROYD & GRIGG, 2002). O seqüenciamento detalhado de múltiplos *loci* das cepas chamadas recombinantes indica que estão presentes alelos semelhantes aos encontrados nas cepas tipo I e tipo III, mas quase nunca ao tipo II (FAZAELI *et al.*, 2000; LEHMANN *et al.*, 2000).

No Brasil, a análise genotípica do *T. gondii* demonstra uma predominância de cepas recombinantes tipo I-III, e a ausência de cepas tipo II. Brandão *et al.* (2006) analisaram isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas e cães no Brasil. Utilizando a PCR-RFLP como ferramenta para analisar o loco SAG2, os autores demonstraram uma prevalência de cepas tipo I e III e a ausência de cepas tipo II. Esses resultados foram semelhantes ao descrito para isolados de galinhas e de gatos domésticos também obtidos no Brasil (DUBEY *et al.*, 2002, 2003 a, b, 2004). Ferreira *et al.* (2006) analisaram 20 cepas de *T. gondii* isoladas de diferentes hospedeiros no Brasil (quatro cepas de pacientes humanos com toxoplasmose congênita, uma de coelho, uma de rato, uma de cabra, três de galinhas e 10 de cães). Utilizando oito *loci* independentes (SAG1, SAG2, SAG3, B1, cB21-4, cS10-A6, GRA6 e L363), os autores classificaram todas as cepas analisadas nesse estudo como recombinantes. Esses autores sugerem que a análise de somente um loco através da PCR - RFLP seja incapaz de identificar cepas híbridas no Brasil. Posteriormente, outros autores analisaram isolados provenientes de humanos e de animais e também verificaram que as cepas do Brasil se diferem substancialmente daquelas linhagens clonais que são comuns na América do Norte e na Europa (KHAN *et al.*, 2006; BELFORT-NETO *et al.*, 2007; DUBEY *et al.*, 2007). Tendo em vista que as cepas recombinantes apresentam um padrão genotípico distinto das cepas de linhagens clonais, elas podem apresentar características peculiares na resposta imune que induzem no hospedeiro e no processo de reinfecção.

1.4- Resposta imune ao *T. gondii*

A resposta imune contra a infecção pelo *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004). A resposta imune em modelos experimentais vai variar em função da linhagem de camundongo e da cepa do parasito que são utilizados, dos locais anatômicos analisados e também da rota de infecção (YAP *et al.*, 2006). Segundo Filisetti & Candolfi (2004), a resposta imune celular é o elemento chave na resistência do hospedeiro contra a infecção pelo *T. gondii* e os anticorpos exercem um papel secundário nessa resistência.

1.4.1- Resposta imune inata e celular na toxoplasmose

A rota normal de infecção pós-natal pelo *T. gondii* é a oral. Quando o parasito chega ao intestino encontra barreiras físicas e químicas que precisa vencer para o estabelecimento da infecção. O *T. gondii* não é considerado um parasito entérico, contudo, ele precisa sofrer uma proliferação inicial e cruzar o epitélio intestinal para se disseminar para os tecidos mais profundos (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). Quando os enterócitos são infectados pelo *T. gondii*, mudanças fisiológicas e morfológicas ocorrem e as células podem secretar moléculas citotóxicas como óxido nítrico (NO) (BUZONI-GATEL & WERTS, 2006). Além disso, os enterócitos respondem à infecção pela secreção de quimiocinas e citocinas que atraem leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, células dendríticas e células Natural Killer (NK) para o local da infecção, sendo que os neutrófilos estão entre as primeiras células a chegarem ao local (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). Portanto, as células polimorfonucleares no local da infecção podem participar do recrutamento e

ativação de outras células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas.

Os macrófagos e as células dendríticas ativados passam a ser uma fonte importante de IL-12 após infecção com *T. gondii* (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). A produção de IL-12 é essencial para induzir a produção de IFN- γ pelas células NK, e o TNF- α pode agir em sinergia com a IL-12 otimizando a produção de IFN- γ por essas células (GAZZINELLI *et al.*, 1993). O IFN- γ , inicialmente produzido pelas células NK, ativa as células dendríticas, os macrófagos e os enterócitos, promovendo a redução ou a eliminação do parasito (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). O IFN- γ é o principal indutor da ativação clássica dos macrófagos, e essas células, além de produzirem IL-12, irão desenvolver uma atividade citotóxica contra o *T. gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1996). Quando os macrófagos são ativados pelo IFN- γ produzem óxido nítrico, uma molécula citotóxica, e promovem a degradação do triptofano que é requerido para o crescimento do parasito, o que permite a inibição da replicação ou a destruição do *T. gondii* por essas células (PFEFFERKORN *et al.*, 1986). Essa ativação inicial do sistema imune parece desenvolver duas funções principais durante a infecção com *T. gondii*. A primeira é a limitação da replicação dos taquizoítos antes do recrutamento da imunidade celular e a segunda é o desenvolvimento direto de uma resposta de células T por direcionar a diferenciação do precursor de células Th em células Th1 efetoras (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Essa diferenciação para Th1 é favorecida devido ao ambiente de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-12 e TNF- α e anti-inflamatórias como TGF- β (GAZZINELLI *et al.*, 1996).

As células da imunidade inata possuem receptores capazes de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), como por exemplo, os

receptores *Toll-like* (TLRs). Estudos demonstram que TLRs têm um papel importante no desencadeamento inicial da resposta imune contra o *T. gondii* (DENKERS, 2010). A sinalização intracelular de TLRs pode envolver o recrutamento da molécula MyD88, sendo que a maioria dos TLRs usam MyD88 para retransmitir os sinais para dentro da célula do hospedeiro (DENKERS, 2003; 2010). Via rota TLR/MyD88, o *T. gondii* induz a produção de IL-12 por leucócitos PMNs, macrófagos, células dendríticas (DENKERS, 2003).

Camundongos MyD88 *knockout* são rapidamente levados à morte após a infecção intraperitoneal com a cepa ME49, de baixa virulência, sugerindo a importância de TLR na resistência do hospedeiro contra o *T. gondii*. A mortalidade foi associada a um alto número de parasitos e a baixos níveis de IL-12 e INF- γ . Além disso, o recrutamento de macrófagos se mostrou defeituoso na ausência de MyD88 (SCANGA *et al.*, 2002). Mais recentemente, Sukhumavasi *et al.* (2008) confirmaram que camundongos MyD88 *Knockout* são altamente suscetíveis à infecção oral pelo *T. gondii*.

Camundongos TLR11 *knockout* apresentam um aumento de suscetibilidade moderado quando comparados com camundongos MyD88^{-/-} e uma alta carga de cistos cerebrais (YAROVINSKY *et al.*, 2005). Camundongos TLR2^{-/-} também apresentam um aumento de suscetibilidade ao *T. gondii*, mas esse efeito só é observado após inóculos com um grande número de parasitos (MUN *et al.*, 2003). Em um estudo usando camundongos TLR2X4^{-/-}, os animais sobreviveram à infecção, contudo, apresentaram um aumento considerável no número de cistos cerebrais (DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2007). Estudos com camundongos TLR4^{-/-} sugerem que a falta de TLR4 aumenta a suscetibilidade à infecção entérica pelo *T.gondii* (FURUTA *et al.*, 2006). Segundo Denkers *et al.* (2010), ainda não há

evidências de que exista um TLR principal que controle a resposta imune contra o *T. gondii*, e provavelmente, a resistência do hospedeiro à infecção está relacionada a múltiplos ligantes TLR.

O IFN- γ é muito importante no desenvolvimento de resposta imune adaptativa, pois atua aumentando a síntese de IL-12 pelos macrófagos expostos a produtos de taquizoítos (MA *et al.*, 1996), induz a expressão do receptor para IL-12 nas células T (JACOBSON *et al.*, 1995) e inibe IL-4, uma importante citocina para diferenciação do fenótipo Th em fenótipo Th2. A IL-4 e a IL-10 são citocinas regulatórias que podem agir em sinergia prevenindo a exacerbação da resposta inflamatória que poderia prejudicar o hospedeiro (GAZZINELLI *et al.*, 1992; LANG *et al.*, 2007).

A IL-10 é um inibidor a imunidade mediada por células que foi primeiramente classificada como citocina tipo Th2 capaz de inibir a produção de IFN- γ pelas células Th1 (FIORENTINO *et al.*, 1989). Contudo, estudos posteriores revelaram que a supressão da síntese IFN- γ pela citocina regulatória IL-10 é devido à habilidade de IL-10 em inibir a produção de IL-1, IL-12 e TNF- α por células acessórias, citocinas que são requeridas para a estimulação ótima da produção de IFN- γ pelas células T e células NK (WILLE *et al.*, 2001). Dessa forma, a IL-10 previne a diferenciação de clones Th1 (D'ANDREA *et al.*, 1993). Além disso, IL-10 tem efeito inibitório sobre os macrófagos, diminuindo, por exemplo, a produção de NO, que é requerido para o controle intracelular do *T. gondii* (WILLE *et al.*, 2001). Segundo Neyer *et al.* (1997), a imunossupressão exercida por IL-10 evita a super-inflamação que eventualmente levaria o hospedeiro à morte, facilitando a sobrevivência do parasito.

A ativação inicial do sistema imune irá desencadear uma resposta imune específica devido à apresentação de antígenos de *T. gondii* aos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas e os macrófagos

(FILISSETTI & CANDOLFI, 2004). A apresentação de antígenos aos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, ocorrendo em um ambiente de IL-12 em sinergia com INF- γ (inicialmente produzido pelas células NK), induz a diferenciação do fenótipo Th em Th1 efetor (CORREA *et al.*, 2007). Segundo Araújo (1991) a população de linfócitos T CD4⁺ é essencial para o desenvolvimento da resistência em camundongos durante a fase inicial da infecção.

Linfócitos Th1 CD4⁺ e os linfócitos T citolíticos CD8⁺ são os principais envolvidos na resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. gondii*, pois agem de forma sinérgica, fornecendo uma imunidade protetora que permite a sobrevivência do mesmo durante a infecção crônica (GAZZINELLI *et al.*, 1991). Os linfócitos T são fontes críticas de INF- γ durante o estágio crônico da infecção, e essa citocina é importante para prevenir a reativação do parasito e o desenvolvimento de encefalite (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Os linfócitos T CD8⁺, ativados pela IL-12 secretada pelos linfócitos T CD4⁺, exercem uma atividade citotóxica contra células infectadas com *T. gondii* (SUBAUSTE *et al.*, 1991).

A resposta imune induzida no hospedeiro também varia de acordo com a cepa de *T. gondii*. Estudos demonstram que cepas virulentas causam infecções letais por induzir uma produção extremamente elevada de citocinas pró-inflamatórias, que se tornam prejudiciais ao hospedeiro ao lesar tecidos parasitados ou normais. Já os animais infectados com cepa avirulenta produzem níveis moderados de INF- γ , IL-12 e TNF- α , o que acarreta no controle da replicação dos parasitos com alterações teciduais mínimas (MORDUE *et al.*, 2001).

1.4.2- Resposta imune humoral na toxoplasmose

Sabe-se que imunoglobulinas M (IgM) são as primeiras a serem produzidas após a infecção pelo *T. gondii*. Em camundongos, a IgM pode ser detectada no fluido peritoneal, ligada à superfície do *T. gondii*, a partir do segundo dia de infecção, contudo, ela demora um pouco mais para aparecer no soro desses animais (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004). Segundo Correa *et al.* (2007), essas imunoglobulinas podem ser detectadas no plasma após 3-10 dias de infecção com *T. gondii*, independente da cepa do parasito, espécie do hospedeiro, sexo ou idade. As IgM são as melhores ativadoras do sistema do complemento e, devido à sua estrutura, são capazes de excelente aglutinação e têm um alto nível de citotoxicidade. Os principais antígenos alvo dessas imunoglobulinas são as proteínas de superfície do parasito (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004). Normalmente IgM está relacionada à fase aguda da infecção, contudo, ela eventualmente pode persistir na fase crônica (GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1996). A sua persistência está sujeita ao grande nível de variação individual do hospedeiro e pode durar até um ano na maioria dos casos (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004).

Segundo Filisetti & Candolfi (2004), as imunoglobulinas G (IgG) são a segunda classe de imunoglobulinas a aparecer durante a toxoplasmose. Elas são compostas de várias subclasses, que aparecem em proporções desiguais durante a infecção. Em camundongos estão presentes as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 e em humanos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (CORREA *et al.*, 2007). Segundo Fiorentino *et al.* (1989), em camundongos as células Th1 produzem IL-12 e IFN- γ e controlam a produção de IgG2a e IgG2b, enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e controlam a produção de IgG1. Em humanos, o padrão de citocinas e subclasses de

IgG é mais complexo. Vários estudos da toxoplasmose humana têm demonstrado que IgG1 é a primeira a ser ativada e é dominante no plasma enquanto IgG2, IgG3 e IgG4 apresentam padrão bastante variável (CORREA *et al.*, 2007). Os anticorpos IgG1 e IgG3 são induzidos por IFN- α e sua produção é aumentada por ação de IL-10 e TGF- β . A produção de IgG2 é induzida por IL-2 e aumentada por IL-6, enquanto IgG4 é induzida por IL-4 e IL-13 (CORREA *et al.*, 2007). Segundo Filisetti & Candolfi (2004), IgG e subclasses promovem a citotoxicidade dependente de anticorpo ou opsonização, graças aos receptores de Fc presentes nos macrófagos e nas células polimorfonucleares, ou devido à citólise mediada por complemento ou por células NK. Os principais alvos de IgG são os antígenos de superfície do *T. gondii* (FILISETTI & CANDOLFI, 2004). Os títulos de anticorpos IgG têm uma tendência a diminuir após a fase aguda da infecção e permanecem baixos e estáveis durante toda a vida do indivíduo infectado pelo *T. gondii* (COUTINHO *et al.*, 1982).

A imunoglobulina A (IgA) é observada em duas formas: IgA de mucosa que é encontrada nas secreções mucosas e IgA do plasma. Na toxoplasmose, as IgA podem ser encontradas no trato digestivo e no plasma de animais e de humanos (FILISETTI & CANDOLFI, 2004). Segundo Chardès & Bout (1993), os anticorpos IgA constituem mais de 80% de todos os anticorpos associados a mucosa e tecido. Essa imunoglobulina persiste por seis a sete meses na toxoplasmose, entretanto varia bastante na quantidade e duração em adultos e recém-nascidos infectados pela via congênita (GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1996). A detecção desse anticorpo é então de grande importância para o diagnóstico da toxoplasmose aguda, já que raramente é encontrado durante a fase crônica da infecção (FERREIRA & BORGES, 2002). Em indivíduos imunodeprimidos, a IgA é tida como marcador prematuro da infecção pelo *T. gondii* em 50% dos casos (PINON *et al.*, 1991). Na toxoplasmose

congenita, a detecção de IgA é valiosa, uma vez que esses anticorpos podem ser detectados mesmo na ausência de IgM. IgA, assim como IgM, não atravessa a placenta e, portanto, está envolvida no diagnóstico da toxoplasmose congênita (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004). O sistema imune na mucosa possui extensa população de células linfóides que rapidamente entram em contato com o parasito durante sua penetração intestinal desencadeando a produção de citocinas e a produção de anticorpos que agem no local (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). Estudos indicam que IgA é um elemento importante da imunidade de mucosa contra a infecção oral por cistos de *T. gondii* e, portanto, esse isotipo de anticorpo pode ser importante para evitar a reinfecção (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Segundo Defrance *et al.* (1992), a resposta de IgA regularmente surge antes de IgG e sua produção é aumentada por estímulo de IL-10 e TGF- β .

Dessa forma, pode-se dizer que os anticorpos são a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o *T. gondii*. As imunoglobulinas irão atuar em taquizoítos extracelulares liberados após o rompimento das células infectadas limitando a multiplicação do *T. gondii* por lisar os parasitos na presença do complemento. Os anticorpos podem também atuar pela opsonização aumentando a capacidade de fagocitose pelos macrófagos (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004).

1.5- Reinfecção pelo *T. gondii*

Na toxoplasmose humana ocorre a persistência de linfócitos T de memória, que provavelmente é mantida pela ruptura regular de cistos intracelulares e talvez por infecções recorrentes através da alimentação. Além disso, anticorpos anti-*T. gondii* permanecem detectáveis durante toda a vida do hospedeiro (FILISSETTI &

CANDOLFI, 2004). Esses fatores imunológicos, em conjunto, seriam importantes para proteger o indivíduo primo-infectado de um evento subsequente de reinfecção (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006).

Segundo Filisetti & Candolfi (2004), é aceito que a resposta imune que se desenvolve no curso da infecção pelo *T. gondii*, em um hospedeiro não imunodeprimido, leva à aquisição de uma imunidade que, no caso de gestantes, protege o feto em um evento subsequente de reinfecção durante a gravidez. Contudo, têm sido relatados casos de toxoplasmose congênita em mulheres imunocompetentes e em fase crônica da toxoplasmose, o que sugere a possibilidade de reinfecção em humanos.

Fortier *et al.* (1991) relataram um caso de aborto espontâneo causado pela reinfecção pelo *T. gondii* durante a gravidez. A mãe, três anos antes da gravidez, já apresentava anticorpos específicos anti-*T. gondii*. Novas análises sorológicas foram realizadas durante a sexta e oitava semanas de gravidez, períodos nos quais a mulher apresentou níveis estáveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e ausência de anticorpos IgA e IgM específicos, confirmando a infecção previamente adquirida. Durante a décima primeira semana de gestação, o ultra-som revelou um retardo no crescimento fetal, e os exames sorológicos maternos mostraram um aumento nos níveis de IgG, associados com altos níveis de IgA específicos. Não foi demonstrado o aparecimento de IgM. O aborto ocorreu na décima segunda semana de gestação, e cistos de *T. gondii* foram encontrados nos tecidos fetais. A mulher não apresentou evidências de imunossupressão e nem de infecção por outros agentes que pudessem ter causado o aborto, o que corrobora a hipótese de reinfecção. A mulher relatou que teve contato com um gato jovem no início da gravidez. Esse gato foi dado ao seu irmão, o qual teve toxoplasmose aguda ao mesmo tempo em que sua

irmã sofreu o aborto. Essas informações sugerem que o gato pode ter sido a fonte de infecção para ambos.

Hennequin *et al.* (1997) relataram o caso de um recém-nascido com lesões oculares e altos títulos de IgG anti- *T. gondii* associado com IgM e IgA específicos. A mãe apresentava, com quatro e 10 semanas de gestação, sorologia anti-*T. gondii* consistente com infecção crônica antiga: títulos moderados e estáveis de IgG e ausência de IgM e IgA específicos. Após o nascimento da criança a mãe apresentava um aumento nos títulos de IgG além de anticorpos IgA específicos. A mãe não apresentou qualquer evento de imunossupressão e, portanto, a hipótese de reinfecção foi a mais consistente. Os autores ainda sugerem que, pelo fato da síntese de IgA estar relacionada com a infecção adquirida pela rota oral, a reinfecção da mãe ocorreu pela ingestão de cistos durante fase mais avançada da gestação.

Um caso de um recém-nascido com coriorretinite devido à toxoplasmose congênita foi diagnosticado pela presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* no soro da criança. A mãe da criança tinha títulos moderados de IgG, mas não tinha IgM, refletindo uma infecção antiga pelo *T. gondii*. A reinfecção da mãe durante a gravidez foi fortemente sugerida devido a emergência de anticorpos IgM e IgA, e um aumento nos títulos de IgG. A reinfecção materna provavelmente estava relacionada com a ingestão acidental de oocistos, pois a mãe relatou ter tido contato com gatos jovens, e uma semana depois ela teve febre (GAVINET *et al.*, 1997).

Silveira *et al.* (2003) relataram, em Erechim (Rio Grande do Sul), um caso de toxoplasmose congênita em recém-nascido do qual a mãe tinha um histórico de cicatriz macular e sorologia positiva para toxoplasmose há 20 anos. O recém nascido apresentou retinocoroidite necrosante focal característica de toxoplasmose,

e títulos de anticorpos IgG e IgM positivos para a doença. Os autores sugerem que grávidas em fase crônica da toxoplasmose também estão sob risco de transmitir o parasito ao feto.

Kodjikian *et al.* (2004) registraram um caso de toxoplasmose congênita em recém-nascido de mãe imunocompetente com infecção crônica antiga pelo *T. gondii*. A sorologia realizada na sétima semana de gravidez revelou níveis estáveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, e a ausência de anticorpos IgM e IgA. A mulher, que vivia na Suíça há seis anos, viajou para o Brasil, onde passou o quinto mês de gravidez e, segundo relatado, se expôs a fatores de risco, como contato diário com gatos jovens e ingestão de carnes cruas e mal cozidas. A análise sorológica do sangue da mãe, colhido logo após o parto, demonstrou um aumento nos títulos de IgG e o surgimento de IgA específico, mas não de IgM. Os testes sorológicos realizados com o sangue retirado do cordão umbilical da criança, logo após o nascimento, revelaram que o recém-nascido estava infectado pelo *T. gondii*. Como a mãe não apresentava nenhum tipo de imunossupressão, os dados acima sugerem que a mãe foi reinfectada pelo *T. gondii* durante a gravidez, transmitindo o parasito ao feto.

Lebas *et al.* (2004) relataram, na França, um caso de bebê que apresentou toxoplasmose congênita disseminada e anormalidades cardíacas ao nascimento. A mãe apresentava infecção crônica pelo *T. gondii*, confirmada por testes sorológicos que revelaram a presença de IgG e ausência de IgM específicos, e não apresentava nenhum tipo de imunossupressão. No oitavo mês de gravidez foi detectado um aumento nos títulos de IgG no sangue materno e a mulher apresentou um quadro febril característico sugerindo a ocorrência de reinfecção durante a gravidez e conseqüente transmissão ao feto. Segundo os autores, a possibilidade de

toxoplasmose congênita deve ser investigada nos recém nascidos, mesmo que a mãe possua uma infecção crônica antiga pelo *T. gondii*, para se iniciar o tratamento adequado o mais rápido possível.

Elbez-Rubinstein *et al.* (2009) estudaram, na França, um caso de toxoplasmose congênita disseminada em um recém-nascido de uma mãe imunocompetente que apresentava infecção prévia pelo *T. gondii* antes da gravidez. Desde a gravidez anterior, a mãe já tinha uma sorologia consistente com uma infecção crônica pelo *T. gondii*, isto é, anticorpos IgG específicos e ausência de IgM. Horas após o nascimento o bebê apresentou um quadro grave, com comprometimento dos órgãos, alterações hematológicas e micro calcificações cerebrais difusas demonstradas por tomografia computadorizada. O diagnóstico da toxoplasmose congênita foi sugerido pelo oftalmologista, que encontrou um foco múltiplo de retinocoroidite em ambos os olhos da criança. A possibilidade de outras infecções bacterianas e virais foi descartada pelos médicos. O diagnóstico foi confirmado pela PCR positiva feita com o sangue do recém nascido obtido oito dias após o nascimento, pelo isolamento do *T. gondii* através da inoculação do sangue periférico em camundongos e pelo encontro de anticorpos IgM específicos no soro da criança. A mãe foi reinfectedada, provavelmente pela ingestão de carne de cavalo crua importada, durante a gravidez e, em seguida, foi detectado um aumento dos títulos de anticorpos IgG anti- *T. gondii* no soro materno. Essa apresentação clínica é excepcional na França e levanta a possibilidade de infecção por uma cepa de *T. gondii* altamente virulenta. A cepa responsável pela infecção congênita, denominada IPP-2002-URB, foi genotipada com marcadores de microsatélite e exibiu um genótipo atípico, que é extremamente incomum na Europa, mas que já foi descrito na América do Sul. Os autores também testaram a hipótese de reinfecção com uma

cepa de genótipo diferente usando um modelo experimental em camundongo. Para isso eles fizeram a infecção primária dos animais com a cepa PRU, classificada como tipo II, e desafiaram os animais com a cepa IPP-2002-URB após um e quatro meses de infecção. A reinfecção foi identificada em quatro dos cinco camundongos que foram desafiados após um mês e em seis dos seis animais desafiados após quatro meses de infecção primária. Os resultados obtidos pelos autores confirmaram que a imunidade adquirida contra cepas européias de *T. gondii* pode não proteger contra a reinfecção por uma cepa atípica adquirida durante viagens para fora da Europa ou ingerindo cistos teciduais em carne importada.

É importante ressaltar que Coutinho *et al.* (1982) relataram um caso de ocorrência de reinfecção pelo *T. gondii* em crianças após o nascimento. O estudo ocorreu em um subúrbio do Rio de Janeiro, Brasil, onde três irmãos tinham toxoplasmose adquirida e tinham títulos positivos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (1:1024, 1:64 e 1:16, respectivamente) em uma família de sete irmãos. A primeira criança apresentava febre e linfadenopatia. No ano seguinte as três crianças apresentavam linfadenopatia e títulos para IgG aumentados. Ao mesmo tempo, outros dois irmãos que anteriormente eram negativos apresentaram títulos positivos para IgG e um deles apresentava anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Após um ano, exames realizados confirmaram se tratar de crianças imunocompetentes e os títulos de IgG havia decrescido na maioria dos irmãos. Os autores acreditam que os três irmãos que anteriormente eram positivos para toxoplasmose sofreram uma reinfecção e não uma reativação simultânea da infecção crônica. O fato de os outros dois irmãos anteriormente negativos terem sido primo-infectados ao mesmo tempo em que os três primeiros apresentaram sintomatologia reforça a hipótese de reinfecção. É possível que a reinfecção em humanos ocorra com grande frequência

devido a constantes exposições ao *T. gondii*. Contudo, os casos de reinfecção em grávidas são mais facilmente detectados devido a triagens pré-natais, à transmissão congênita e suas consequências para o recém-nascido.

Segundo Dao *et al.* (2001) esses relatos com suspeita de ocorrência de reinfecção podem ser importantes para se reconsiderar a susceptibilidade de humanos a vários genótipos de *T. gondii* que podem influenciar na ocorrência ou não da reinfecção.

Alguns estudos em modelos experimentais foram realizados com o intuito de verificar a ocorrência da reinfecção. Araújo *et al.* (1997) avaliaram a ocorrência de reinfecção com as cepas ME49 (avirulenta), C56 (virulenta) e R-C56, que é uma variante de C56 resistente a atovaquona. Esses autores observaram um aumento no número de cistos no cérebro de camundongos primo infectados com ME49 e desafiados com a cepa C56 e sua variante, R-C56, quando comparados com os animais infectados somente com a cepa ME49. Apesar da acentuada produção de anticorpos e da resposta imune mediada por células, os camundongos em fase crônica da infecção desenvolveram a doença e morreram de toxoplasmose aguda quando foram reinfetados com a cepa R-C56, mas não tratados. Além disso, a resposta imune não foi capaz de prevenir a invasão do cérebro dos animais nem a formação de cistos teciduais da cepa usada no desafio. O bioensaio foi o método de escolha utilizado para determinar a ocorrência de reinfecção. Para a realização do bioensaio, os autores obtiveram cistos provenientes do cérebro dos animais desafiados e inocularam em novos camundongos, sendo que, a morte do camundongo do bioensaio era considerada sinônimo de reinfecção, tendo em vista que indicava a presença da cepa virulenta no material inoculado. Dessa forma, os autores demonstraram que a resposta imune de camundongos infectados com a

cepa ME49 e em fase crônica da toxoplasmose não foi capaz de prevenir, após o desafio, a invasão do cérebro dos animais pelas cepas C56 e R-C56 e a formação de novos cistos cerebrais. Os autores demonstraram que a toxoplasmose aguda pode ocorrer em hospedeiros imunocompetentes após sua reinfecção com outra cepa, realçando a importância das diferenças entre as cepas na patogênese da toxoplasmose. Em adição, Araújo *et al.* (1997) sugerem que alguns casos de toxoplasmose aguda em indivíduos com evidências sorológicas de infecção prévia podem ser devido à reinfecção, principalmente quando existe um enfraquecimento no sistema imune causado por doença ou por terapia concomitante.

Dao *et al.* (2001) testaram a hipótese de reinfecção usando cepas de diferentes genótipos: a cepa Ned (tipo III), a cepa 76K (tipo II) e a cepa Pruβgal derivada da cepa Prugniaud (tipo II). Esta cepa foi transfectada com o gene da β-galactosidase de *Escherichia coli*. Com a inserção desse gene os cistos da cepa Pruβgal adquiriam cor azul após coloração, permitindo desta forma a identificação dos cistos das diferentes cepas no cérebro de um mesmo camundongo. Quando os camundongos foram primo infectados com a cepa 76K e reinfectedados com a cepa Pruβgal não houve a formação de novos cistos teciduais referentes à cepa do desafio, em nenhum dos tempos testados (um mês, dois meses e quatro meses após a infecção primária). Contudo, quando a infecção primária foi realizada com a cepa Pruβgal e os camundongos foram desafiados com a cepa Ned, alguns dos animais se reinfectedaram. Através desses experimentos os autores observaram que o resultado da reinfecção depende do genótipo da cepa utilizada, sugerindo não haver reinfecção quando são usadas duas cepas de mesmo genótipo e ocorrendo reinfecção quando as cepas utilizadas são de genótipos diferentes. Por outro lado, Freyre *et al.* (2004), avaliando a reinfecção por *T. gondii* em ratos, concluíram que

não há relação entre proteção e genótipo das cepas utilizadas. A cepa BK (tipo I) utilizada pelos autores para induzir imunidade estéril foi capaz de conferir proteção contra reinfecção com algumas cepas tipo II (C, Prugniaud e ME49), mas não contra outras cepas do tipo II (Elg, Bear e M3) também utilizadas no desafio.

Dzitko *et al.* (2006), com a finalidade de avaliar a capacidade dos testes imunoenzimáticos em reconhecer a reinfecção pelo *T. gondii*, infectaram camundongos BALB/c com a cepa DX (genótipo II) e após 12 semanas fizeram o desafio com a cepa BK (genótipo I), altamente virulenta. Eles avaliaram o nível e o perfil da produção de anticorpos utilizando as técnicas de ELISA e “immunoblot” e verificaram que 3 semanas após a reinfecção houve um aumento nos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, além da produção de novos anticorpos capazes de reconhecer antígenos relacionados à cepa utilizada no desafio. Segundo Dzitko *et al.* (2006), esse estudo confirma os resultados previamente obtidos por Araújo *et al.* (1997) e por Dao *et al.* (2001), que demonstraram, por diferentes métodos, que a resposta imune obtida pela infecção primária em hospedeiros imunocompetentes pode não ser suficiente para prevenir a reinfecção com o parasito de um genótipo diferente.

A reinfecção experimental em camundongos utilizando cepas recombinantes tipo I-III de *T. gondii* isoladas no Brasil foi avaliada, pela primeira vez, por nosso grupo (BRANDÃO *et al.*, 2009). Os autores utilizaram a cepa D8 (avirulenta) para primo infecção de camundongos BALB/c, e realizaram o desafio com as cepas virulentas CH3, EGS e N após 45 ou 180 dias da infecção primária, em diferentes grupos de animais. O bioensaio e a PCR-RFLP foram as técnicas utilizadas para confirmar a reinfecção, e, além disso, foram feitas a pesquisa de diferentes isotipos de anticorpos anti-*T. gondii* pelo método de ELISA e a dosagem das citocinas IL-10

e INF- γ no sobrenadante de esplenócitos dos camundongos primo infectados. Quando os camundongos BALB/c foram desafiados aos 45 dias de primo infecção, o bioensaio e a PCR-RFLP mostraram reinfecção com as cepas EGS e N, mas não com a cepa CH3. Por outro lado, quando o desafio ocorreu 180 dias após a infecção primária, a reinfecção ocorreu com todas as cepas. Estes resultados possivelmente estão relacionados ao alto nível de IL-10 observados na cultura de esplenócitos dos camundongos com 180 dias de infecção quando comparado aos camundongos com 45 dias de infecção com a cepa D8. Isso sugere uma tendência a uma resposta antiinflamatória na fase crônica avançada da toxoplasmose, o que poderia ter favorecido a reinfecção aos 180 dias. Os níveis plasmáticos de IgG1 e de IgA também estavam maiores em camundongos BALB/c com infecção crônica de 180 dias pela cepa D8, o que pode estar relacionado com o aumento da produção de IL-10. Os autores verificaram que a ocorrência da reinfecção é influenciada tanto pelo tempo transcorrido entre a infecção primária e o desafio como pelo genótipo das cepas de *T. gondii* utilizadas (BRANDÃO *et al.*, 2009).

1.6- Ciclofosfamida: droga imunossupressora

A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada que tem sido utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer. Contudo, por apresentar propriedades imunossupressoras, a ciclofosfamida também tem sido usada no tratamento de doenças autoimunes e imunopatias não específicas, e para prevenção da rejeição de transplantes (ALLISON, 2000; GARCIA *et al.*, 2004; Baxter Oncology GmbH – comunicação pessoal; EMADI *et al.*, 2009). A ciclofosfamida é ainda usada para tratar doenças nas quais auto-anticorpos têm um papel patogênico, como lupus

eritematoso sistêmico (ALLISON, 2000). A droga foi sintetizada em 1958, e a partir daí foi extensivamente estudada e utilizada no tratamento de tumores, devido ao seu excelente índice terapêutico (SHAND, 1979). A atividade imunossupressora da ciclofosfamida foi posteriormente descoberta por Stender *et al.* (1959), que demonstraram que, assim como a radiação, a droga suprime a formação de anticorpos. Santos *et al.* (1964) mostraram que esse fato também é verdadeiro para humanos, e iniciaram a aplicação da ciclofosfamida em casos de transplante de medula óssea. Dessa forma, além de ser utilizada para o tratamento de neoplasias, a droga também passou a ser utilizada para deprimir o sistema imune. Segundo Garcia *et al.* (2004) a droga é um potente imunodepressor, atuando em células com alta atividade mitótica, inibindo tanto a resposta imune humoral quanto celular. Os metabólitos da ciclofosfamida são agentes alquilantes que têm como alvo alguns componentes das moléculas de DNA da célula em divisão. Os principais produtos são 4-hidroxíciclofosfamida e o tautômero acíclico, aldofosfamida; a clivagem do último gera a mostarda fosforamida, que pode alquilar o DNA e suprimir a divisão celular (SHAND, 1979; ALLISON, 2000). A ciclofosfamida tem efeito principalmente nas células B, e o efeito nas células T depende da dosagem utilizada e do momento de administração da droga em relação à exposição ao antígeno (ROLLINGHOFF *et al.*, 1977). Embora a ciclofosfamida pareça ter um efeito maior nos linfócitos B em baixas doses, virtualmente, todo o tipo de célula e aspecto da resposta inflamatória e imunológica pode ser suprimido por altas doses da droga, incluindo a resposta mediada por linfócitos T (SHAND, 1979; TURK & PARKER, 1979). Sob algumas condições, a droga pode aumentar a resposta citotóxica celular (ROLLINGHOFF *et al.*, 1977). Geralmente, esses efeitos potencializadores imunes têm sido observados quando a droga é administrada antes da exposição ao antígeno ou em baixas doses

(HERMANS *et al.*, 2003). Segundo Hafizi & Modabber (1978), é aceito que a ciclofosfamida dada antes da estimulação antigênica suprime a formação de anticorpos, mas aumenta a reação de hipersensibilidade tardia, contudo a administração da droga após a estimulação antigênica resulta também na supressão da reação de hipersensibilidade tardia.

Os efeitos adversos bem conhecidos da ciclofosfamida incluem leucopenia (que normalmente é utilizada como guia da terapia), cistite hemorrágica, cardiotoxicidade e alopecia. A droga aumenta o risco de câncer no paciente, contudo, a ciclofosfamida continuará a ser usada até que um supressor da formação de anticorpos mais seguro seja encontrado (ALLISON, 2000; EMADI *et al.*, 2009).

Diversas drogas têm sido utilizadas em modelos de imunodepressão em várias espécies animais, como a dexametasona, a ciclosporina, a ciclofosfamida e o metrotexato. Todavia, o efeito dessas drogas não é o mesmo em todas as espécies (GARCIA *et al.*, 2004). Em camundongos, Doherty (1981) mostrou que a ciclofosfamida inibe a produção de anticorpos, mas não conseguiu mostrar o efeito da droga na resposta celular cutânea. Já Tarayre *et al.* (1990) encontraram leucopenia em camundongos tratados com essa droga.

1.7- Ciclofosfamida e a infecção pelo *T. gondii*

Existem poucos estudos que avaliam os efeitos da ciclofosfamida na infecção pelo *T. gondii* em animais experimentais. Hafizi & Modabber (1978) avaliaram o papel dos anticorpos no estabelecimento de uma imunidade protetora em camundongos contra a infecção com uma cepa avirulenta de *T. gondii*. Para isso, os autores administraram a ciclofosfamida em dose única um dia antes da infecção,

dose que, segundo os autores, é capaz de inibir preferencialmente os linfócitos B. Eles verificaram que o tratamento com a ciclofosfamida retardou o aparecimento de anticorpos anti-*T. gondii* em aproximadamente uma semana, mas subsequentemente os títulos de anticorpos aumentaram lentamente até se tornarem equivalentes aos títulos de um animal não tratado, por volta do dia 60. Os autores constataram também que os efeitos do tratamento com a ciclofosfamida na mortalidade dos animais infectados foram mais pronunciados, sendo que 70% dos animais morreram dentro de 4 semanas. No entanto, a mortalidade foi consideravelmente reduzida quando os camundongos tratados com ciclofosfamida e infectados pelo *T. gondii* eram passivamente imunizados com o soro obtido de camundongos com 50-100 dias de infecção pela mesma cepa de *T. gondii*. Todos os animais mortos foram examinados para verificar a presença de taquizoítos em vários órgãos, e essa forma evolutiva foi encontrada em abundância na cavidade peritoneal, pulmão, fígado e baço logo após a morte dos animais tratados com ciclofosfamida, o que indica que eles morreram devido à infecção pelo *T. gondii* e não devido aos efeitos tóxicos da droga. Os autores concluíram que os efeitos imunossupressores da ciclofosfamida previnem o estabelecimento de uma relação balanceada entre parasita-hospedeiro, e que os anticorpos exercem um papel importante no estabelecimento da imunidade durante a infecção pelo *T. gondii*.

Hofflin *et al.* (1987) administraram drogas imunossupressoras em camundongos na tentativa de estabelecer um modelo murino de encefalite causada pelo *T. gondii*. O tratamento com a ciclofosfamida iniciou-se dois dias antes da infecção intracerebral com taquizoítos de *T. gondii* e doses de manutenção foram administradas a cada cinco dias pelo período de um mês. Os animais tratados foram sacrificados em tempos diferentes após a infecção e seus cérebros foram

submetidos à avaliação histológica. Fígado, baço, coração e pulmão de alguns desses camundongos foram removidos, processados e inoculados em outros animais que, após seis semanas, eram avaliados para constatar a infecção pelo *T. gondii*. A análise histológica do cérebro dos animais tratados com ciclofosfamida revelou um grau variável de resposta inflamatória, indo de nenhum infiltrado celular evidente (mais comumente observado) até uma quantidade moderada de inflamação na região do sítio de inoculação. Após quatro dias de infecção, foram vistos grupos de parasitos intracelulares e uma pequena quantidade de parasitos extracelulares quando comparado com animais que receberam outra droga imunossupressora (acetato de cortisona), sendo que esses taquizoítos se encontravam em pequenos grupos. Destruição do tecido foi encontrada no local de inoculação, independente da presença de infiltrados celulares inflamatórios. Após 14 dias de infecção muitos cistos estavam presentes e claramente havia um número maior de cistos e agrupamentos de cistos no cérebro dos camundongos tratados com ciclofosfamida do que no cérebro dos camundongos tratados com outras drogas imunossupressoras. Focos distantes de infecção com o predomínio similar de organismos intracelulares se desenvolveram no parênquima cerebral contra lateral ao sítio de inoculação, no coração e nos pulmões desses animais. No grupo controle, os animais infectados e não tratados desenvolveram necrose no sítio de inoculação, cercado por áreas com intensa inflamação mononuclear e formação de cistos, e os taquizoítos não foram mais detectados após duas semanas. Os autores discutem que a predominância de cistos no cérebro dos camundongos tratados com ciclofosfamida pode estar relacionada com a diminuição da imunossupressão nos intervalos entre as injeções da droga, o que permitiria que períodos de formação de

cistos e de agrupamentos de cistos se alternassem com períodos de proliferação de taquizoítos.

Para analisar os efeitos da ciclofosfamida na composição celular e no funcionamento do baço e do linfonodo durante a infecção pelo *T. gondii*, Jones *et al.* (1987) trataram camundongos com uma dose única da droga pela via intraperitoneal três dias antes ou três dias após o inóculo com uma cepa avirulenta do parasito. Animais controle foram esplenectomizados três semanas antes da infecção pelo *T. gondii*. Para avaliar os efeitos da droga na carga de cistos cerebrais, os camundongos foram sacrificados entre 40 a 50 dias após a infecção e o número de cistos no cérebro foi contado. Os autores verificaram que houve uma diminuição significativa no número de cistos no cérebro dos camundongos que receberam a ciclofosfamida antes da infecção, e daqueles que sofreram esplenectomia. No entanto, quando a ciclofosfamida foi administrada três dias após a infecção, houve um aumento significativo na carga de cistos cerebrais, além de um aumento na mortalidade. A resposta de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *T. gondii* injetado via subcutânea foi maior nos animais pré-tratados com ciclofosfamida e nos animais esplenectomizados. Quando o tratamento com ciclofosfamida precedeu a infecção pelo *T. gondii*, a composição celular do baço e dos linfonodos 12 dias após a infecção foi alterada, pois houve uma diminuição dos linfócitos B e linfócitos T, e aumento dos fagócitos mononucleares. Os autores verificaram que células provenientes do baço desses animais têm a sua proliferação em resposta a antígenos de *T. gondii* suprimida “in vitro” por até 25 dias, contudo a proliferação de células dos linfonodos não foi suprimida, havendo uma boa proliferação de linfócitos. A produção de IFN- γ por células provenientes do baço em resposta aos antígenos de *T. gondii* ficou reduzida durante seis a dez dias após a infecção, contudo,

passados 20 dias de infecção, a produção de IFN- γ tornou-se similar à de um camundongo infectado e não tratado por ciclofosfamida. Os autores concluem que a ciclofosfamida administrada antes da infecção experimental pelo *T. gondii* aumenta a resistência do hospedeiro ao parasito, pois diminui o número de cistos cerebrais e encurta o período da doença. Contudo, quais desses fatores (aumento de fagócitos mononucleares ou diminuição de linfócitos T) são responsáveis pela resistência ainda permanece desconhecido. Assim como Hafizi & Modabber (1978), Jones *et al.* (1987) também notaram que a ciclofosfamida induz uma diminuição nos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

2- JUSTIFICATIVA

O número de pacientes imunodeprimidos suscetíveis a diferentes infecções oportunistas tem aumentado a cada década e atingiu o auge com o estabelecimento da AIDS no começo dos anos 80. O uso crescente de transplantes (rim, medula óssea, fígado, coração, etc.) e a utilização extensiva de drogas imunossupressoras nesses pacientes, como também em pacientes com neoplasias e doenças autoimunes, conduziram a um elevado número de indivíduos com imunodepressão crônica, facilitando a ocorrência de infecções oportunistas graves, como a toxoplasmose, que é a infecção por protozoário mais freqüente em indivíduos imunocomprometidos. Dentre as drogas imunossupressoras disponíveis está a ciclofosfamida, um agente alquilante que é utilizado há vários anos e que atualmente ainda é comumente empregada. Contudo existem poucos trabalhos que avaliam os efeitos dessa droga na infecção pelo *T. gondii*. Sabe-se que a imunodepressão do sistema imune pode conduzir à reativação da infecção latente e à disseminação do parasito, entretanto ainda não existem estudos que verificam se a imunodepressão pode favorecer a reinfecção pelo *T. gondii*.

Estudos recentes vêm ressaltando a importância do genótipo da cepa no processo de reinfecção, contudo esses estudos ainda são escassos, controversos e pouco conclusivos, permanecendo a questão se cepas pertencentes a genótipos diferentes podem ou não fornecer uma proteção imune suficiente para impedir a reinfecção do hospedeiro. São necessários estudos adicionais para avaliar a participação do genótipo do parasito e da resposta imune do hospedeiro no processo de reinfecção pelo *T. gondii*. Caso a ocorrência da reinfecção possa ser favorecida por diferenças genotípicas entre as cepas e pela imunossupressão do

hospedeiro, será necessário implementar um processo de prevenção primária da toxoplasmose entre imunocomprometidos e grávidas previamente soropositivos para *T. gondii* e, quando possível, estabelecer programas de monitoramento efetivos a fim de diagnosticar precocemente o aparecimento de doença aguda.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Estudar a reinfecção pelo *T. gondii* em camundongos BALB/c imunossuprimidos com ciclofosfamida utilizando cepas do parasito isoladas no Brasil e pertencentes a tipos genéticos recombinantes.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1- Avaliar a mortalidade e o número de cistos cerebrais em camundongos primo infectados imunossuprimidos ou não, em relação a camundongos desafiados com diferentes cepas de *T. gondii*;

3.2.2- Detectar, através do bioensaio e PCR-RFLP, a ocorrência de reinfecção nos camundongos imunocompetentes e nos camundongos imunossuprimidos;

3.2.3- Verificar se a imunossupressão de camundongos em fase crônica recente da doença aumenta as chances de reinfecção pelo *T. gondii*;

3.2.4- Verificar se as diferenças genótípicas entre as cepas de *T. gondii* podem influenciar na ocorrência de reinfecção.

3.2.5- Analisar a cinética da produção de anticorpos IgA, IgM, IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a nos camundongos normais e nos camundongos imunossuprimidos durante o processo de reinfecção;

3.2.6- Avaliar a ação da ciclofosfamida no número de leucócitos em sangue circulante de camundongos BALB/c primo infectados.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Parasitos

Neste estudo foram utilizadas quatro cepas de *T. gondii*: D8, ME49, CH3 e EGS. A cepa D8, de baixa virulência para camundongos, foi isolada de cão e é classificada como cepa do tipo III para o loco SAG2 e recombinante (I-III) quando submetida à análise de mais de um loci (TAB. 1). A cepa CH3, isolada de galinha, é virulenta, e foi caracterizada como tipo III para o loco SAG2 e também recombinante (I-III) quando submetida à análise de diferentes loci (TAB. 1). A cepa EGS foi isolada de líquido amniótico humano, é virulenta e foi classificada como tipo I para o loco SAG2 e também como recombinante (I-III) (TAB. 1) (FERREIRA *et al.*, 2006). A cepa ME49, isolada de carne de carneiro em 1965, é uma cepa de baixa virulência para camundongos (LUNDE & JACOBS, 1983) e é classificada como cepa do tipo II quando submetida à análise de diferentes loci, inclusive o loco SAG2 (TAB. 1) (FERREIRA *et al.*, 2006). Com exceção da cepa ME49 que foi isolada nos Estados Unidos da América, as outras cepas foram isoladas em Minas Gerais, Brasil (FERREIRA *et al.*, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2006). Essas cepas são mantidas por passagens sucessivas em camundongos “Swiss” através do inóculo de cinco cistos teciduais pela via oral a cada 3-5 meses. Camundongos inoculados com cepas virulentas (CH3 e EGS) são tratados por 10 dias com sulfadiazina (500 mg/l) via oral na água oferecida aos animais (DUBEY & BEATTIE, 1988) para cronificar a infecção.

TABELA 1 - Genótipos de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de humanos e animais no Brasil determinados por PCR-RFLP em oito locos independentes. As cepas RH (Tipol), ME49 (Tipoll) e VEG (Tipolll) foram utilizadas como cepas de referência (adaptado de Ferreira *et al.*, 2006).

Cepa	Alelo e haplótipo no loco indicado																				
	SAG1		H ^b	SAG2		SAG3		GRA6		B1		L363		cS10-A6		cB21-4					
	ER ^a			ER	H	ER	H	ER	H	ER	H	ER	H	ER	H	ER	H				
	DdeI	Sau961	HhaI	Sau3AI	NciI	MseI	XhoI	PmlI	MspI	HpyCH4V	RsaI	HpyCH4V	HaellI								
RH (I)	1	1	I	1	1	I	1	I	1	I	1	1	I	1	I	1	I	1	I		
ME49 (II)	2	2	II/III	2	1	II	2	II	2	II	2	2	II/III	2	1	II	1	2	II	2	II
VEG (III)	2	2	II/III	1	2	III	3	III	3	III	2	2	II/III	3	2	III	2	1	III	3	III
EGS	1	1	I	1	1	I	3	III	2	II	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	6	VI
CH3	1	1	I	1	2	III	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	3	III
D8	1	1	I	1	2	III	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	2	1	III	3	III

^a Endonuclease de restrição utilizada para digestão do loco indicado.

^b Haplótipo

4.2- Camundongos

Os camundongos fêmeas da linhagem BALB/c utilizados neste estudo foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. No início do experimento os animais apresentavam idade entre quatro a seis semanas e peso entre 18 e 20g. Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo nº 038/05).

4.3- Infecção primária dos camundongos

Para realização da infecção primária, camundongos “Swiss” com aproximadamente três meses de infecção pelas cepas D8 e ME49 foram sacrificados por deslocamento cervical e seu cérebro retirado e macerado em tubos de hemólise. Ao macerado foi adicionado 1ml de PBS pH 7,2 estéril e os cistos contidos em 10µl do homogeneizado foram contados em duplicata ao microscópio ótico entre lâmina e lamínula. O material foi então diluído de forma a se obter uma concentração de 20 cistos por 100µl de solução. Foram inoculados 20 cistos por via oral das cepas D8 e ME49 em diferentes camundongos BALB/c fêmeas. De acordo com o grupo experimental, esses animais foram mantidos até a realização da imunossupressão (que se iniciou 40 dias após a infecção primária) e/ou do desafio com as cepas CH3 e EGS (que ocorreu 45 dias após a infecção primária).

4.4- Imunossupressão com a ciclofosfamida

A droga escolhida para realizar a imunossupressão dos camundongos foi a ciclofosfamida (Genuxal®, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen - Alemanha). Os camundongos BALB/c fêmeas primo infectados com as cepas D8 e ME49 eram pesados sempre antes de realizar a imunossupressão. A dosagem de Cy utilizada foi 70 mg/Kg/camundongo semanalmente, dissolvida em PBS pH 7,2 estéril, imediatamente antes do uso, de forma que 0,2ml da solução fosse inoculada pela via intraperitoneal em cada animal (KHALIFA *et al.*, 2000). O tratamento dos camundongos primo infectados com as cepas D8 e ME49 com Cy se iniciou 5 dias antes do desafio com as cepas CH3 e EGS e prosseguiu com a administração de doses semanais da droga até o final do experimento. Como controle, uma parte dos camundongos primo infectados com as cepas D8 e ME49 e imunossuprimidos foram mantidos sem reinfecção, e a outra parte dos camundongos primo infectados com as cepas D8 e ME49 foram mantidos sem imunossupressão, seguidos ou não de reinfecção. Camundongos normais BALB/c sem nenhuma infecção foram imunossuprimidos concomitantemente aos demais camundongos servindo também como grupo controle.

Todos os camundongos, imunossuprimidos ou não, foram tratados com antibióticos: amoxicilina + ácido clavulânico (Sigma-Clav® BD – EMS S/A, Sigma Pharma) na concentração de 1g/l de água com a finalidade de evitar infecções bacterianas que possam ser favorecidas pela supressão do sistema imune dos animais. O medicamento foi oferecido continuamente aos camundongos na mamadeira no lugar da água de beber, e a renovação do antibiótico era feita 3 vezes por semana.

4.5- Desafio de camundongos BALB/c com as cepas CH3 e EGS

O desafio dos camundongos BALB/c com as cepas CH3 e EGS foi realizado 45 dias após a infecção primária com as cepas D8 e ME49, tanto em camundongos que estavam recebendo Cy quanto em camundongos não imunossuprimidos. Para a realização do desafio, camundongos “Swiss” com aproximadamente três meses de infecção pelas cepas CH3 ou EGS foram sacrificados por deslocamento cervical e seu cérebro retirado e macerado em tubos de hemólise. Ao macerado foi adicionado 1ml de PBS pH 7,2 estéril e os cistos contidos no homogeneizado foram contados em duplicata ao microscópio ótico entre lâmina e lamínula. O material foi então diluído de forma a se obter uma concentração de 20 cistos por 100µl de solução, assim como realizado durante a infecção primária, e todos os camundongos desafiados foram inoculados com 20 cistos pela via oral.

4.5.1- Desafio de camundongos BALB/c após a infecção primária com a cepa D8

Os camundongos primo infectados com a cepa D8 e não imunossuprimidos foram divididos em 3 grupos de 10 animais. O grupo A foi desafiado com 20 cistos da cepa CH3 (D8+CH3), o grupo C foi desafiado com 20 cistos da cepa EGS (D8+EGS) e o grupo E (D8) foi mantido sem desafio, somente infectado com a cepa D8 (Figura 1).

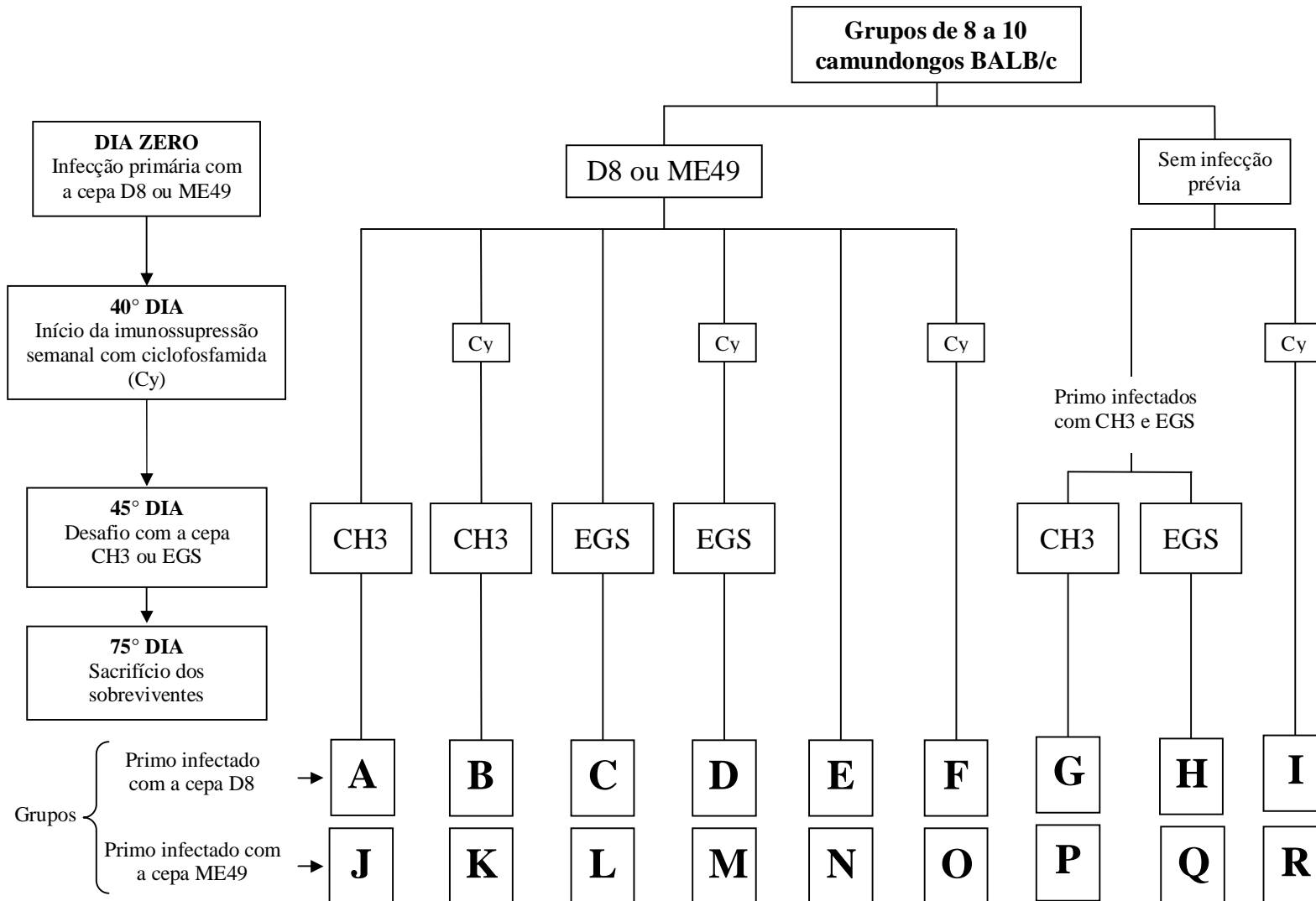
Os camundongos primo infectados com a cepa D8 que foram imunossuprimidos semanalmente com Cy (início 5 dias antes do desafio) também foram divididos em 3 grupos. O grupo B foi imunossuprimido e desafiado com 20 cistos da cepa CH3 (D8+CH3/I), o grupo D foi imunossuprimido e desafiado com 20

cistos da cepa EGS (D8+EGS/I) e o grupo F (D8/I) foi mantido sem desafio, somente com a cepa D8 seguida de imunossupressão.

Camundongos normais BALB/c fêmeas provenientes das mesmas ninhadas dos animais submetidos ao desafio foram primo infectados com 20 cistos das cepas CH3 (grupo G) e EGS (grupo H), na mesma data do desafio dos demais grupos, servindo como controles do experimento.

Camundongos normais BALB/c sem nenhuma infecção foram imunossuprimidos concomitantemente aos demais camundongos servindo também como grupo controle (grupo I).

FIGURA. 1- Delineamento experimental



4.5.2- Desafio de camundongos BALB/c após a infecção primária com a cepa ME49

O desafio dos animais primo infectados com a cepa ME49 seguiu o mesmo protocolo de desafio dos animais primo infectados com a cepa D8, conforme descrito no item anterior.

Os camundongos primo infectados com a cepa ME49 e não imunossuprimidos foram divididos em 3 grupos de 8 a 9 animais. O grupo J foi desafiado com 20 cistos da cepa CH3 (ME49+CH3), o grupo L foi desafiado com 20 cistos da cepa EGS (ME49+EGS) e o grupo N (ME49), infectado somente com a cepa ME49, foi mantido sem desafio (Figura 1).

Os camundongos primo infectados com a cepa ME49 que foram imunossuprimidos semanalmente com Cy também foram divididos em 3 grupos. O grupo K foi imunossuprimido e desafiado com 20 cistos da cepa CH3 (ME49+CH3/I), o grupo M foi imunossuprimido e desafiado com 20 cistos da cepa EGS (ME49+EGS/I) e o grupo O (ME49/I) foi mantido sem desafio, infectado somente com a cepa ME49 seguida de imunossupressão.

Camundongos normais BALB/c fêmeas provenientes das mesmas ninhadas dos animais submetidos ao desafio foram primo infectados com 20 cistos das cepas CH3 (grupo P) e EGS (grupo Q), na mesma data do desafio dos demais grupos, servindo como controles do experimento.

Camundongos normais BALB/c sem nenhuma infecção foram imunossuprimidos concomitantemente aos demais camundongos servindo também como grupo controle (grupo R).

4.5.3- Delineamento experimental da infecção primária, da imunossupressão e do desafio dos camundongos BALB/c

O delineamento experimental da infecção primária e do desafio dos camundongos BALB/c está apresentado na Figura 1. A mortalidade dos animais de todos os grupos experimentais (de A a R) foi acompanhada por um período de trinta dias a partir da data na qual ocorreu o desafio. Os animais sobreviventes de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical e um quarto do cérebro (metade anterior direita) foi conservado para posterior análise histopatológica, que será realizada em trabalhos futuros. Foram retirados 20 cistos dos três quartos restantes do cérebro de cada camundongo para a realização do bioensaio em novos camundongos BALB/c, a fim de verificar a virulência da(s) cepa(s) presente(s) no cérebro dos animais sobreviventes (item 4.6). Todo o restante dos três quartos do cérebro de cada sobrevivente foi utilizado para inocular camundongos “Swiss” normais pela via intraperitoneal com o intuito de realizar a coleta de taquizoítos do peritônio dos mesmos e, posterior tipagem genética desse material por PCR-RFLP (item 4.7). Para isto, os cistos contidos no macerado individual obtido do cérebro de cada animal sobrevivente foram tratados com solução de pepsina (pepsina 1,3g; NaCl 3.5g; HCl 2,5g; H₂O dest. qsp 500ml) em banho-maria a 37°C por 10min, lavados com PBS 7,2 estéril e inoculados separadamente em camundongos “Swiss” pela via intraperitoneal. Entre 5 a 7 dias após o inóculo, o peritônio desses animais foi lavado com PBS 7,2 estéril para coleta de taquizoítos, que foram conservados a -20°C até a extração de DNA.

4.6- Bioensaio

Os camundongos sobreviventes dos grupos experimentais (grupos de A a R) foram sacrificados por deslocamento cervical 30 dias após o desafio, e o cérebro foi retirado. Três quartos do cérebro dos animais foram macerados em tubo de hemólise e ao macerado foram adicionados 750µl de PBS pH 7,2 estéril. Os cistos cerebrais do homogeneizado obtido foram contados ao microscópio ótico, entre lâmina e lamínula, e o material diluído em PBS pH 7,2 estéril de forma a se obter 20 cistos em 100µl de suspensão. Para cada camundongo sobrevivente, um novo camundongo BALB/c foi inoculado individualmente com 20 cistos cerebrais pela via oral, a fim de se realizar o bioensaio. A mortalidade dos animais foi acompanhada diariamente por um período de 30 dias. Aos 28 dias do inóculo do bioensaio, os camundongos sobreviventes foram sangrados pelo plexo orbital para obtenção de soro, que foi submetido à pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, pelo método de ELISA, para confirmar a infecção. Passados os 30 dias, os animais sobreviventes foram sacrificados, seus cérebros retirados, macerados e examinados ao microscópio ótico para averiguar a presença de cistos. A morte de um camundongo usado no bioensaio foi considerada consequência da presença da cepa virulenta de *T. gondii* (CH3 ou EGS) utilizada no desafio do camundongo que anteriormente foi primo infectado com a cepa avirulenta, D8 ou ME49, confirmando a reinfeção do mesmo (ARAÚJO *et al.*, 1997; BRANDÃO *et al.*, 2009).

4.7- Tipagem genética dos re-isolados de *T. gondii*

4.7.1- Extração de DNA

A massa de taquizoítos, da qual o DNA foi extraído, foi obtida pela lavagem asséptica do peritônio de camundongos “Swiss” que foram previamente infectados, pela via intraperitoneal, com os cistos obtidos dos animais sobreviventes 30 dias após o desafio. A extração do DNA foi realizada com o Kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”, da Promega, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O DNA obtido foi estocado a temperatura de 4°C, até o uso.

4.7.2- PCR-RFLP (Reação em cadeia de polimerase - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição)

Além da mortalidade e do bioensaio, outra ferramenta utilizada para verificar a ocorrência de reinfecção nos animais sobreviventes foi a PCR-RFLP, capaz de identificar a presença de diferentes genótipos de *T. gondii* no cérebro dos animais desafiados. A análise pela PCR-RFLP foi realizada em dois segmentos de DNA: *cS10-A6* e *L363* (Tabela 1), segundo Ferreira *et al.* (2006).

TABELA 2 - Marcadores utilizados na PCR-RFLP em segmentos de DNA de *T. gondii*.

Marcador	Iniciadores	Produto (pb)	Endonucleases de restrição	Referências
<i>L363</i>	(F) GGCTATTCGGCAAACAACAC (R) GCAATCCAGTGAGTCACCAA	505	<i>HpyCH4IV</i>	SU <i>et al.</i> (2002)
<i>cS10-A6</i>	(F) CTGGTTACATTTTCGCCTATCA (R) CCTAGTCCAACTAGGGCTTGA	341	<i>RsaI</i>	SU <i>et al.</i> (2002)

Iniciadores “forward” (F) e “reverse” (R) indicam as extremidades 5’ e 3’, respectivamente.

Para realização das reações de amplificação foram adicionados em um tubo de microcentrífuga: 5pmol de cada iniciador; 200 μ M de cada deoxiribonucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP, dCTP - Promega); 0,5 unidade da enzima "Go Taq Flexi" DNA polimerase (Promega); 2 μ l de tampão "Go Taq Flexi Green" 5X pH 8.5 (Promega); 1 μ l de tampão MgCl₂ 25mM (Promega) e aproximadamente 5ng de DNA molde. As reações de amplificação foram processadas num volume final de 10 μ l. O primeiro passo para a amplificação consistiu de três minutos de desnaturação a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 60 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 55°C para anelamento, e extensão a 72°C por 60 segundos. O passo de extensão no ciclo final foi aumentado para 5 min.

Foi preparado um mini-gel de poliacrilamida (PAGE) a 5% no qual uma alíquota de 2 μ l dos produtos das reações de amplificação foi submetida à eletroforese (SAMBROOK *et al.*, 1989). A corrida foi processada a 100 volts, por aproximadamente uma hora, até que as amostras percorressem 3,5 cm.

O gel foi corado durante 10 minutos em uma solução de nitrato de prata a 0,17%, para a visualização dos fragmentos amplificados, após fixação em uma solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Para a revelação foi utilizada uma solução contendo 3% de NaOH (p/v) e 0,3% de formaldeído 37% (v/v) (SANTOS *et al.*, 1993). As imagens do gel foram capturadas usando máquina fotográfica digital.

As digestões com as endonucleases de restrição (Tabela 1) foram realizadas em um volume final de 10 μ l contendo 1 μ l do tampão correspondente, 3 μ l do produto da PCR (aproximadamente 5 μ g de DNA) e 2,5U (0,25 μ l) da enzima a 37°C conforme protocolo descrito pelo fabricante. O produto digerido foi purificado pela extração com fenol/clorofórmio (1:2), submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%,

corado com nitrato de prata e as imagens foram novamente capturadas usando máquina fotográfica digital. Foram utilizadas como controle cepas de *T. gondii* dos genótipos clonais tipo I (RH), II (ME49) e III (VEG) (FUX *et al.*, 2003).

4.8- ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”)

Todos os animais dos grupos experimentais A a F e J a O foram sangrados duas vezes pelo plexo retro-orbital com pipeta de Pasteur umedecidas com heparina. A primeira coleta ocorreu 40 dias após a infecção primária, antes de realizar o desafio, e a segunda coleta ocorreu 30 dias após o desafio. Os animais dos grupos controle, I e R, foram sangrados simultaneamente aos demais grupos experimentais. O sangue foi centrifugado e o plasma obtido foi estocado à -20°C até a realização da sorologia. Esses plasmas foram testados para pesquisa de anticorpos IgA, IgM e IgG (IgG total, IgG1 e IgG2a) anti - *T. gondii* pelo método de ELISA, de acordo com Elsaid *et al.* (2001). A cinética de produção de anticorpos por esses animais foi avaliada para análise comparativa da produção de anticorpos, no momento das coletas, pelos animais imunossuprimidos e não imunossuprimidos antes e após o desafio, além da análise comparativa da produção de anticorpos pelos camundongos imunossuprimidos em relação aos não imunossuprimidos, desafiados pelas diferentes cepas de *T. gondii*.

Para preparação do antígeno, taquizoítos da cepa RH foram obtidos de camundongos “Swiss” previamente infectados. O peritônio dos camundongos foi lavado com PBS pH 7,2 e o material obtido foi lavado três vezes por centrifugação em PBS pH 7,2. Uma alíquota de 10^7 taquizoítos foi sonicada, centrifugada e estocada a -20°C até o momento do uso, sendo denominada antígeno solúvel de

taquizoítos. A concentração de proteínas foi estimada segundo Lowry *et al.*, (1951). O antígeno solúvel de taquizoítos foi diluído em tampão carbonato pH 9,6 a uma concentração de 5µg/ml. A placa de ELISA foi sensibilizada com 100µl deste antígeno em cada orifício por 18 horas, a 4°C. Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com solução salina contendo Tween 20 a 0,05% e o plasma diluído em PBS-Tween-20, 0.05% (PBS-T) em diferentes concentrações (1:100 para IgG e 1:50 para IgG1, IgG2a, IgM e IgA) foi adicionado (Brandão *et al.*, 2009). A placa foi incubada por 45 minutos a 37°C, lavada e posteriormente foi adicionado anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2a (1:10000), anti-IgM (1:1000) ou anti-IgA (1:2500) de camundongo marcado com peroxidase (Sigma). Após 45 minutos de incubação a 37°C, a placa foi lavada e o substrato (orto-fenilenodiamino + H₂O₂ em ácido cítrico, pH 5,0) foi adicionado. Para interromper a reação foram utilizados 30 µl de H₂SO₄ 4N e para realizar a leitura automatizada foi utilizado um leitor de microplacas da BIO RAD modelo 3550 e filtro de 490nm.

4.9- Leucograma

A produção de glóbulos brancos em camundongos BALB/c não imunossuprimidos e imunossuprimidos com Cy foi avaliada pela contagem de leucócitos do sangue circulante obtido em quatro coletas a fim de monitorar os efeitos da droga sobre essas células.

Para isso, dez camundongos foram infectados pela via oral com 20 cistos das cepas D8 e dez com a cepa ME49. Após 38 dias, o plasma dos animais foi testado por ELISA para confirmar a infecção. Dez animais também foram mantidos sem infecção servindo como controle do experimento. Após 40 dias, grupos de cinco

camundongos foram imunossuprimidos com Cy (um grupo infectado com D8, um grupo infectado com ME49 e um grupo sem infecção), pela via intraperitoneal, na dosagem de 70mg/Kg/camundongo e, à partir daí, os animais foram tratados semanalmente com a droga, conforme descrito anteriormente. Grupos de cinco camundongos foram mantidos sem imunossupressão para controle do experimento (um grupo infectado com D8, um grupo infectado com ME49 e um grupo sem infecção). A primeira coleta de sangue para a realização do leucograma foi realizada 45 dias após a infecção, no momento em que ocorreria o desafio. A segunda coleta de sangue foi realizada 55 dias após a infecção, a terceira coleta ocorreu 65 dias após a infecção e a quarta coleta, 75 dias após a infecção. Os animais mantidos sem infecção, foram sangrados simultaneamente aos animais infectados. Amostras de sangue de cada camundongo foram coletadas pelo plexo retro-orbital com pipetas de Pasteur umedecidas com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético dissódico) e homogeneizadas em tubos contendo EDTA antes da utilização.

A partir do sangue colhido com EDTA, foi feita uma diluição a 1:20 com a solução diluidora (ácido acético glacial: 30ml, azul de metileno a 1%: 2 gotas, e água destilada q.s.p. 1000ml), para lise das hemácias e coloração do núcleo dos leucócitos pelo azul de metileno. A contagem global dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer. Após a contagem e multiplicação pelo fator de correção da câmara, os valores foram expressos em leucócitos/mm³ de sangue.

Para a contagem diferencial foram feitos esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa. Ao microscópio de luz foram contados 100 leucócitos através de movimentos de ziguezague ao longo do esfregaço sangüíneo. As células foram classificadas em Basófilos, Eosinófilos, Linfócitos, Monócitos e Neutrófilos. O

resultado foi expresso em leucócitos/mm³ de sangue, representando o valor absoluto de cada tipo celular.

4.10- Análise Estatística

As diferenças entre o número médio de cistos no cérebro dos camundongos e a média das absorbâncias obtidas pelo ELISA nos diferentes grupos foram avaliadas com o teste Kruskal-Wallis. As diferenças entre o número médio de cada tipo celular obtido no leucograma foram analisadas pelos testes Kruskal-Wallis e Mann Whitney. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Para essas análises, foi utilizado o Programa “GraphPad Prism” versão 4.00 para Windows, Software GraphPad, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com.

5- RESULTADOS

5.1- Sobrevivência, número de cistos cerebrais e bioensaio dos camundongos BALB/c imunossuprimidos ou não com Cy e desafiados com as cepas CH3 e EGS

5.1.1- Camundongos BALB/c desafiados após a infecção primária com a cepa D8.

Quando os camundongos BALB/c foram primo infectados com as cepas CH3 e EGS (grupos G e H) a sobrevivência foi de 0%. Todos os animais morreram em até 15 dias de infecção. Já os animais primo infectados com a cepa D8 (grupo E) apresentaram 100% de sobrevivência durante os 30 dias de acompanhamento (GRAF. 1 e TAB. 3). Os animais primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas CH3 (grupo A) e EGS (grupo C) também apresentaram sobrevivência de 100%. Quando os camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 foram imunossuprimidos com Cy (grupo F) a sobrevivência também foi de 100%. Todos os animais primo infectados, imunossuprimidos e posteriormente desafiados com a cepa CH3 (grupo B) também sobreviveram (100%). No entanto, os animais primo infectados, imunossuprimidos e desafiados com a cepa EGS (grupo D) tiveram uma sobrevivência de 40%. Os camundongos BALB/c normais, sem infecção prévia, que foram imunossuprimidos com Cy concomitantemente aos demais animais (grupo I), apresentaram 100% de sobrevivência (GRAF. 1 e TAB. 3).

O número de cistos no cérebro dos animais imunocompetentes primo infectados com D8 e desafiados com CH3 (grupo A) e EGS (grupo C) não foi

diferente ($p > 0,05$) do número de cistos no cérebro dos animais infectados somente com D8 (grupo E) (GRAF. 2 e TAB. 3). Já o número de cistos cerebrais nos animais primo infectados com D8, imunossuprimidos e desafiados com CH3 (grupo B) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o número de cistos dos animais infectados com D8 e imunossuprimidos (grupo F). Houve também um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no número de cistos no cérebro dos camundongos primo infectados com D8, imunossuprimidos e desafiados com EGS (grupo D) em relação aos camundongos não imunossuprimidos e desafiados com EGS (grupo C). (GRAF. 2 e TAB. 3).

No bioensaio, todos os camundongos BALB/c que foram inoculados com 20 cistos provenientes do cérebro de animais primo infectados com D8 (grupo E) e animais primo infectados com D8 e imunossuprimidos (grupo F) sobreviveram (TAB 3). Os camundongos que foram inoculados com cistos oriundos de animais primo infectados com D8 e desafiados com CH3 (grupo A) também apresentaram sobrevivência de 100%. Por outro lado, animais inoculados com cistos procedentes de camundongos que foram desafiados com EGS (grupo C) apresentaram 90% de sobrevivência. Quando os camundongos BALB/c do bioensaio receberam os cistos cerebrais de animais primo infectados com D8, imunossuprimidos com Cy e desafiados com CH3 (grupo B) a sobrevivência foi de 100%, no entanto, quando os camundongos foram inoculados com cistos provenientes de camundongos imunossuprimidos desafiados com EGS (grupo D) a sobrevivência foi de 75% (TAB 3). Todos os camundongos sobreviventes do bioensaio apresentaram cistos no cérebro e ELISA-IgG positivo para *T. gondii* (TAB. 3).

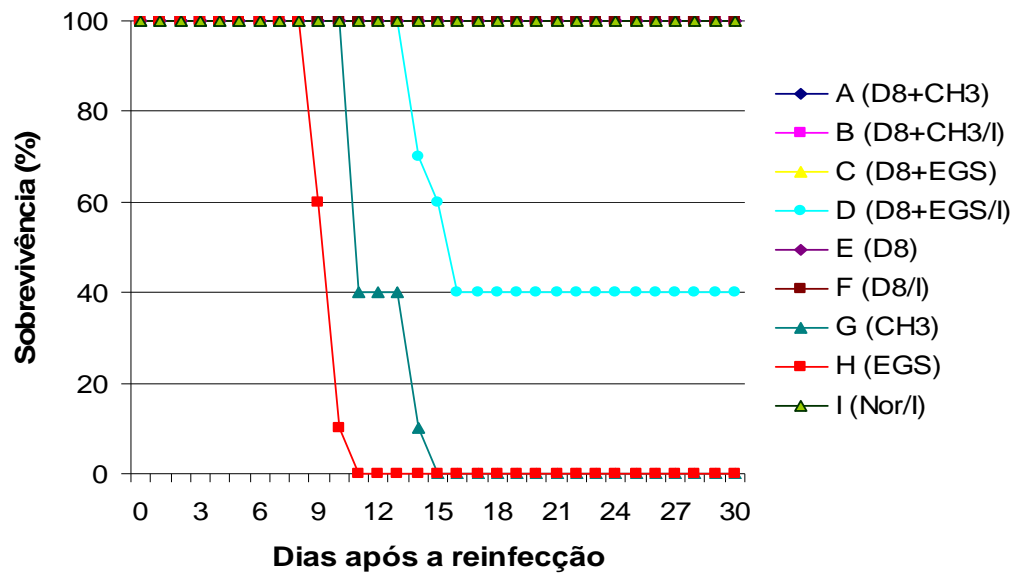


GRÁFICO 1 - Sobrevivência de camundongos BALB/c primo infectados com cistos da cepa D8, seguido ou não de imunossupressão com Cy, e desafiados com cistos das cepas CH3 e EGS após 45 dias de infecção primária. Grupos A a I: ver descrição no texto.

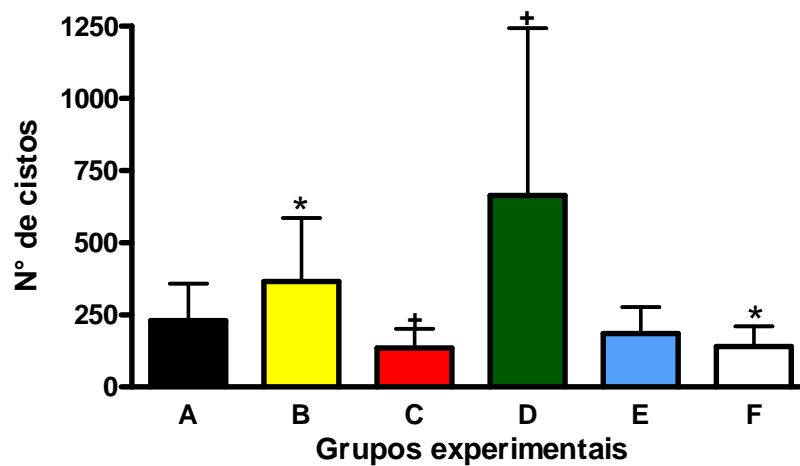


GRÁFICO 2 - Número médio e desvio padrão de cistos cerebrais de camundongos BALB/c sobreviventes após a infecção primária com a cepa D8, seguida ou não de imunossupressão, e posterior desafio com as cepas CH3 e EGS. Grupos experimentais: A (D8+CH3), B (D8+CH3/I), C (D8+EGS), D (D8+EGS/I), E (D8) e F (D8/I). * - $p < 0,05$ (Grupo B X Grupo F). + - $p < 0,05$ (Grupo C X Grupo D).

TABELA 3 - Sobrevivência, cistos cerebrais e bioensaio de camundongos BALB/c primo-infectados com a cepa D8 de *T. gondii*, imunossuprimidos ou não com Cy, e desafiados após 45 dias com as cepas CH3 e EGS. O bioensaio foi avaliado pela sobrevivência, presença de cistos cerebrais e de anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfecção.

Grupo	Cepas	Reinfecção		Bioensaio		
		Sobrevivência ^a	Número de cistos cerebrais ^b	Sobrevivência ^a	Presença de cistos cerebrais ^c	Anticorpos ^d
A	D8+CH3	10/10 (100%)	230,0 ± 127,4	10/10 (100%)	10/10	10/10
B	D8+CH3/I	10/10 (100%)	365,0 ± 219,9 ^e	10/10 (100%)	10/10	10/10
C	D8+EGS	10/10 (100%)	135,0 ± 66,9 ^f	9/10 (90%)	9/9	9/9
D	D8+EGS/I	4/10 (40%)	662,5 ± 579,3 ^f	3/4 (75%)	3/3	3/3
E	D8	10/10 (100%)	185,0 ± 91,4	10/10 (100%)	10/10	10/10
F	D8/I	10/10 (100%)	140,0 ± 69,9 ^e	10/10 (100%)	10/10	10/10
G	CH3	0/10 (0%)	NS	NF	NF	NF
H	EGS	0/10 (0%)	NS	NF	NF	NF
I	Normais/I	10/10 (100%)	0	NF	NF	NF

a = camundongos sobreviventes/total de camundongos inoculados.

b= média e desvio padrão do número de cistos cerebrais dos camundongos sobreviventes 30 dias após o desafio.

c= camundongos com cistos cerebrais/total de camundongos sobreviventes do bioensaio.

d= camundongos com anticorpos IgG (ELISA) anti-*T. gondii* / total de camundongos sobreviventes do bioensaio.

e= diferença significativa entre camundongos primo infectados com a cepa D8 imunossuprimidos e camundongos primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos e posteriormente desafiados com a cepa CH3 (p <0,05).

f= diferença significativa entre camundongos imunocompetentes primo infectados com a cepa D8 posteriormente desafiados com a cepa EGS e camundongos primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos e posteriormente desafiados com a cepa EGS (p <0,05).

NS= não sobreviveram.

NF= não feito.

5.1.2- Camundongos BALB/c desafiados após a infecção primária com a cepa ME49.

Os camundongos BALB/c primo infectados com as cepas CH3 e EGS (grupos P e Q) apresentaram 100% de mortalidade. Os animais primo infectados com a cepa ME49 (grupo N) apresentaram 100% de sobrevivência (GRAF. 3). Todos os animais primo infectados com a cepa ME49 e posteriormente desafiados com a cepa CH3 (grupo J) sobreviveram (100%). Quando os camundongos foram primo infectados com ME49 e desafiados com a cepa EGS (grupo L), a sobrevivência foi de 89%. Os camundongos BALB/c primo infectados com a cepa ME49 e imunossuprimidos (grupo O) apresentaram 88% de sobrevivência. Os animais primo infectados com a cepa ME49, imunossuprimidos e posteriormente desafiados com a cepa CH3 (grupo K) apresentaram 78% de sobrevivência. Entretanto, todos animais que foram primo infectados com ME49, imunossuprimidos e desafiados com a cepa EGS (grupo M) morreram (0% de sobrevivência). Camundongos BALB/c normais imunossuprimidos (grupo R) apresentaram 100% de sobrevivência (GRAF. 3).

O número de cistos no cérebro dos animais primo infectados com a cepa ME49 e desafiados com a EGS (grupo L) aumentou significativamente ($p < 0,05$) quando comparado ao número de cistos no cérebro dos camundongos infectados somente com ME49 (grupo N) (GRAF. 4 e TAB. 4). Nenhuma outra diferença estatística entre os grupos de interesse foi observada.

No bioensaio, os camundongos BALB/c inoculados com cistos provenientes de camundongos primo infectados com a cepa ME49 (grupo N) apresentaram sobrevivência de 100%. Entre os sete camundongos do bioensaio que foram inoculados com cistos oriundos de animais primo infectados com ME49 e

posteriormente imunossuprimidos (grupo O), um camundongo morreu, sendo que a sobrevivência foi de 85,7% (TAB. 4). Todos os camundongos BALB/c do bioensaio que foram inoculados com 20 cistos procedentes do cérebro de animais primo infectados com ME49 e desafiados com CH3 (grupo J) sobreviveram (100%). Por outro lado, os camundongos inoculados com cistos provenientes dos animais que foram imunossuprimidos e desafiados com CH3 (grupo K) apresentaram 42,8% de sobrevivência (TAB. 4). Quando os camundongos receberam os cistos cerebrais dos animais que foram primo infectados com ME49 e desafiados com EGS (grupo L) todos os animais morreram (0% de sobrevivência). Não foi possível realizar o bioensaio dos camundongos primo infectados com ME49, imunossuprimidos e desafiados com EGS (grupo M), pois não houve sobreviventes (TAB. 4). Todos os camundongos sobreviventes do bioensaio apresentaram cistos no cérebro e ELISA-IgG positivo para *T. gondii*. (TAB. 4)

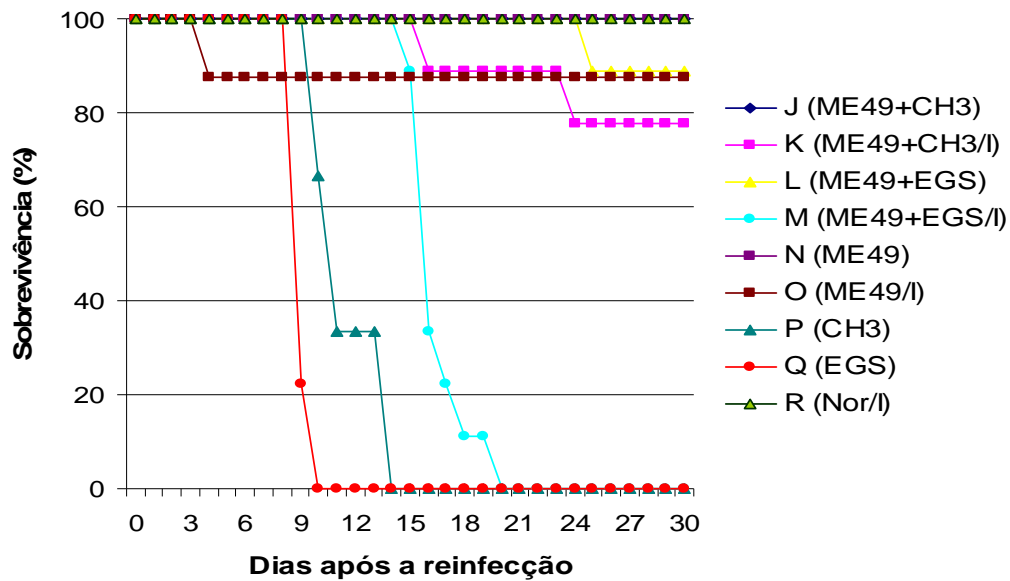


GRÁFICO 3 - Sobrevivência de camundongos BALB/c primo infectados com cistos da cepa ME49, seguidos ou não de imunossupressão com Cy, e desafiados com cistos das cepas CH3 e EGS após 45 dias de infecção primária. Grupos J à R: ver descrição no texto.

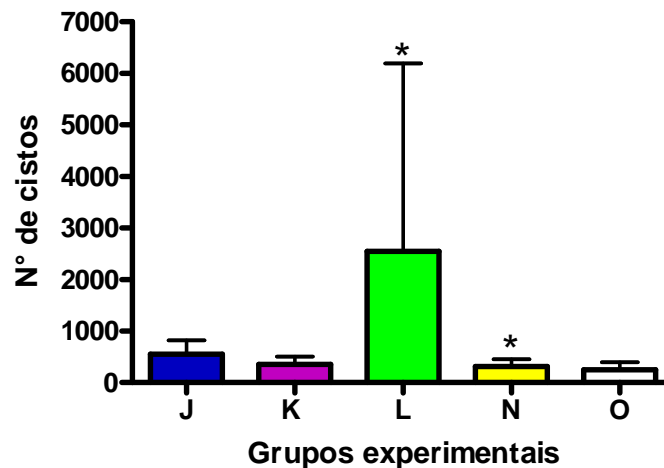


GRÁFICO 4 - Número médio e desvio padrão de cistos cerebrais de camundongos BALB/c sobreviventes após a infecção primária com a cepa ME49, seguida ou não de imunossupressão, e posterior desafio com as cepas CH3 e EGS. Grupos experimentais: J (ME49+CH3), K (ME49+CH3/I), L (ME49+EGS), N (ME49) e O (ME49/I). * - $p < 0,05$ (Grupo L X Grupo N).

TABELA 4 - Sobrevivência, cistos cerebrais e bioensaio de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa ME49 de *T. gondii*, imunossuprimidos ou não com Cy, e desafiados após 45 dias com as cepas CH3 e EGS. O bioensaio foi avaliado pela sobrevivência, presença de cistos cerebrais e de anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfecção.

Grupo	Cepas	Reinfecção		Bioensaio		
		Sobrevivência ^a	Número de cistos cerebrais ^b	Sobrevivência ^a	Presença de cistos cerebrais ^c	Anticorpos ^d
J	ME49+CH3	9/9 (100%)	551,1 ± 270,9	9/9 (100%)	9/9	9/9
K	ME49+CH3/I	7/9 (77,8%)	350,0 ± 155,5	3/7 (42,8%)	3/3	3/3
L	ME49+EGS	8/9 (88,9%)	2543,7 ± 3646,9 ^e	0/8 (0%)	NS	NS
M	ME49+EGS/I	0/9 (0%)	NS	NF	NF	NF
N	ME49	8/8 (100%)	312,5 ± 138,2 ^e	8/8 (100%)	8/8	8/8
O	ME49/I	7/8 (87,5%)	250,0 ± 141,4	6/7 (85,7%)	6/6	6/6
P	CH3	0/9 (0%)	NS	NF	NF	NF
Q	EGS	0/9 (0%)	NS	NF	NF	NF
R	Normais/I	9/9 (100%)	0	NF	NF	NF

a= camundongos sobreviventes/total de camundongos inoculados.

b= média e desvio padrão do número de cistos cerebrais dos camundongos sobreviventes 30 dias após o desafio.

c= camundongos com cistos cerebrais/total de camundongos sobreviventes do bioensaio.

d= camundongos com anticorpos IgG (ELISA) anti-*T. gondii*/total de camundongos sobreviventes do bioensaio.

e= diferença significativa entre camundongos imunocompetentes primo infectados com a cepa ME49 e camundongos imunocompetentes primo infectados com a cepa ME49 posteriormente desafiados com a cepa EGS ($p < 0,05$).

NS= não sobreviveram.

NF= não feito

5.2- Tipagem genética dos re-isolados de *T. gondii* obtidos de camundongos BALB/c desafiados com as cepas CH3 e EGS após 45 dias de primo infecção, seguida ou não de imunossupressão com ciclofosfamida (Cy)

5.2.1- Camundongos BALB/c desafiados após a infecção primária com a cepa D8.

A confirmação da reinfecção em camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos ou não, e desafiados com as cepas CH3 e EGS foi feita por meio da reação de amplificação com o marcador molecular *cS10-A6* e clivagem com a endonuclease de restrição *RsaI*, procedimento que permite a distinção entre o material genético da cepa utilizada na infecção primária e o da cepa utilizada no desafio.

A análise do DNA de *T. gondii* obtido de cada camundongo imunocompetente desafiado com a cepa CH3 (grupo A) e de cada camundongo imunossuprimido com Cy e desafiado com CH3 (grupo B) mostrou a presença somente do produto característico da cepa D8 em todos os animais (TAB. 5 e FIG.2A e 2B). A coexistência das duas cepas foi demonstrada no cérebro de 9 dos 10 camundongos que foram desafiados com a cepa EGS (grupo C), pois estava presente tanto o produto característico da cepa D8 quanto o produto característico da cepa EGS (TAB. 5 e FIG. 2C). A análise do DNA obtido dos camundongos sobreviventes após a infecção primária com a cepa D8, imunossupressão com Cy e desafio com a cepa EGS (grupo D) revelou que 2 animais entre 4 estavam coinfectados pelas duas cepas, pois os produtos referentes às mesmas estavam presentes (TAB. 5 e FIG. 2D).

TABELA 5 – Genotipagem dos loci *cS10-A6* e *L363* de cepas de *T. gondii* por PCR-RFLP. O DNA foi extraído de taquizoítos obtidos do peritônio de camundongos “Swiss” inoculados por via intraperitoneal 5-7 dias antes com cistos cerebrais provenientes de camundongos BALB/c sobreviventes após a primeira infecção com as cepas D8 ou ME49, seguida ou não de imunossupressão pela Cy, e posterior desafio com as cepas CH3 e EGS.

Fonte de DNA (individual)		Reinfecção		
		Sobrevivência ^a	PRC-RFLP ^b	
			Locus	
Grupo	Cepas		<i>cS10-A6</i>	<i>L363</i>
A	D8+CH3	10/10 (100%)	0/10 (0%)	NF ^c
B	D8+CH3/I	10/10 (100%)	0/10 (0%)	NF ^c
C	D8+EGS	10/10 (100%)	9/10 (90%)	NF ^c
D	D8+EGS/I	4/10 (40%)	2/4 (50%)	NF ^c
J	ME49+CH3	9/9 (100%)	NF ^d	4/9 (44,4%)
K	ME49+CH3/I	7/9 (77,8%)	NF ^d	5/7 (71,4%)
L	ME49+EGS	8/9 (88,9%)	NF ^d	8/8 (100%)
M	ME49+EGS/I	0/9 (0%)	NF ^d	NF ^e

a= camundongos sobreviventes/total de camundongos desafiados.

b= revela o n° de camundongos coinfetados com as duas cepas/ total de camundongos analisados (todos sobreviventes após o desafio foram analisados).

NF^c= não feito, pois *L363* não permite a distinção entre as cepas D8/CH3 e D8/EGS.

NF^d= não feito, pois *cS10-A6* não permite a distinção entre as cepas ME49/CH3 e ME49/EGS.

NF^e= não feito, pois nenhum camundongo do grupo M sobreviveu ao desafio.

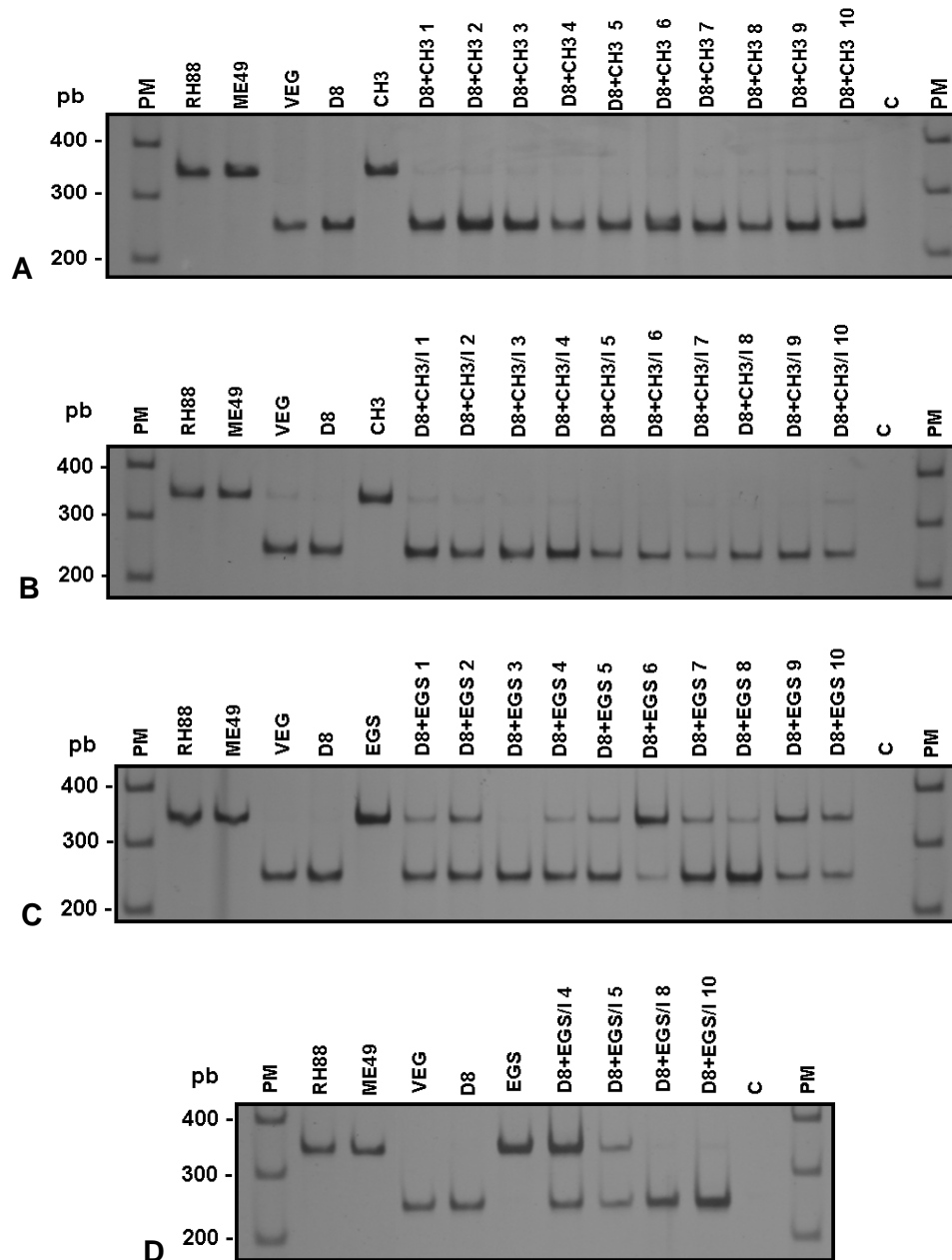


FIGURA 2 – PCR-RFLP do loco *cS10-A6* de *T. gondii* com a endonuclease de restrição *RsaI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, em DNA extraído de taquizoítos obtidos do peritônio de camundongos “Swiss” inoculados individualmente por via intraperitoneal 5-7 dias antes com cistos cerebrais provenientes de camundongos BALB/c sobreviventes após a primo infecção com a cepa D8, seguida ou não de imunossupressão pela Cy, e posterior desafio com as cepas CH3 e EGS. (A) camundongos desafiados com CH3, (B) camundongos imunossuprimidos desafiados com CH3, (C) camundongos desafiados com EGS e (D) camundongos imunossuprimidos desafiados com EGS. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

5.2.2- Camundongos BALB/c desafiados após a infecção primária com a cepa ME49.

Para diferenciar o material genético da cepa ME49 utilizada na infecção primária do material genético das cepas CH3 e EGS utilizadas no desafio, foi feita a reação de amplificação com o marcador molecular L363 e clivagem com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*, o que permitiu confirmar a reinfeção dos camundongos BALB/c.

A análise pela PCR-RFLP revelou que 4 dos 9 camundongos imunocompetentes que foram desafiados com CH3 (grupo J) estavam coinfectados com as duas cepas, pois tanto o produto correspondente à cepa ME49 quanto o produto correspondente à cepa CH3 foram encontrados (TAB. 5 e FIG. 3A). A coexistência dos produtos característicos das cepas ME49 e CH3 foi demonstrada em 5 dos 7 camundongos sobreviventes após a infecção primária, imunossupressão com Cy e desafio com CH3 (grupo K) (TAB. 5 e FIG. 3B). A análise individual do DNA de *T. gondii* mostrou que 100% dos animais sobreviventes após a infecção primária com ME49 e desafio com a cepa EGS apresentavam o produto correspondente à cepa EGS. Contudo, o produto correspondente à cepa ME49 não foi encontrado em nenhum dos camundongos (TAB. 5 e FIG. 3C). Como nenhum dos animais primo infectados e imunossuprimidos com Cy sobreviveu ao desafio com a cepa EGS, não foi possível realizar a PCR-RFLP desse grupo.

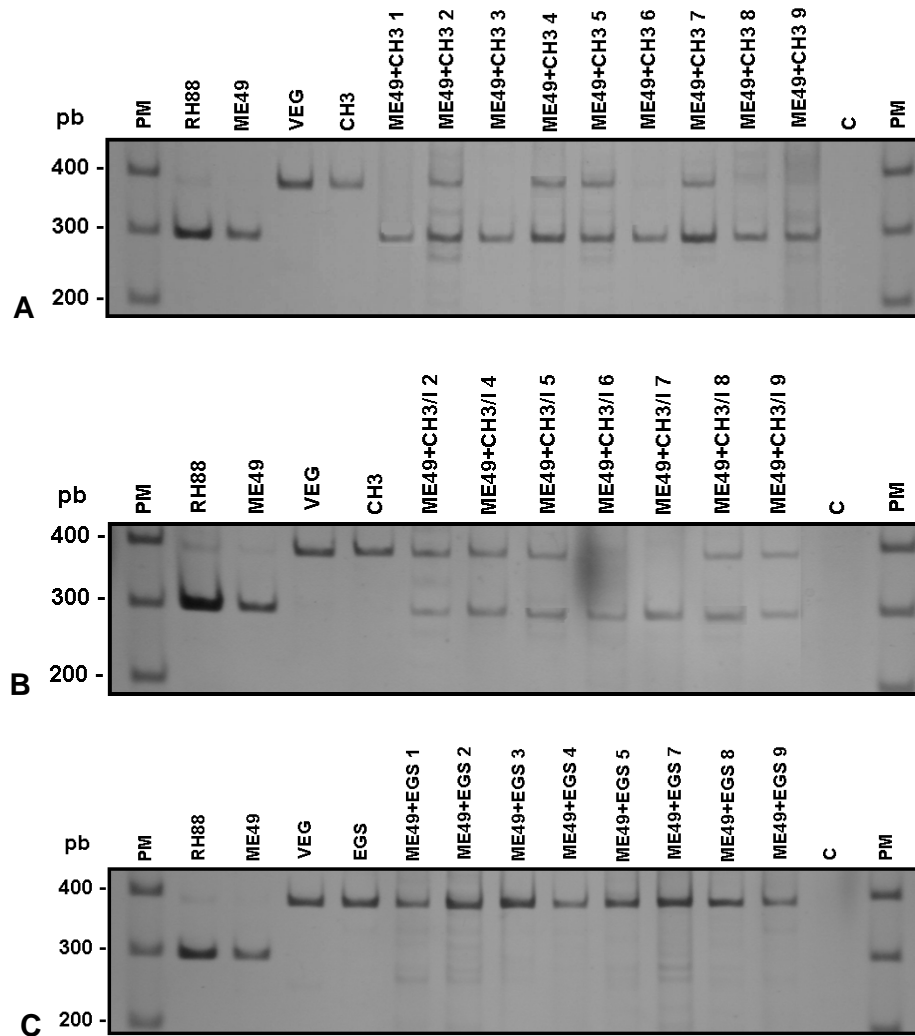


FIGURA 3 – PCR-RFLP do loco *L363* de *T. gondii* com a endonuclease de restrição *HpyCH4I*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, em DNA extraído de taquizoítos obtidos do peritônio de camundongos “Swiss” inoculados individualmente por via intraperitoneal 5-7 dias antes com cistos cerebrais provenientes de camundongos BALB/c sobreviventes após a primo infecção com a cepa ME49, seguida ou não de imunossupressão pela Cy, e posterior desafio com as cepas CH3 e EGS. (A) camundongos desafiados com CH3, (B) camundongos imunossuprimidos desafiados com CH3 e (C) camundongos desafiados com EGS. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

5.3- Anticorpos anti-*T. gondii*, avaliados pelo método de ELISA, em camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos ou não pela Cy, e desafiados com as cepas CH3 e EGS

5.3.1- Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos imunocompetentes desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa D8

Os níveis de anticorpos IgG e IgG1 anti- *T.gondii* dosados no plasma dos animais primo infectados com D8 e desafiados com CH3 (grupo A) e EGS (grupo C), expressos como valores em absorbância, apresentaram um aumento no 30º dia em relação ao dia zero. No entanto, o grupo controle infectado somente com D8 (grupo E) também apresentou um aumento semelhante nos níveis desses anticorpos (GRAF. 5 a e b). Os anticorpos IgG2a apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) do dia 0 em relação ao dia 30 somente no grupo de camundongos primo infectados com D8 e desafiados com EGS (grupo C). Nos demais grupos não houve alteração significativa (GRAF. 5 c).

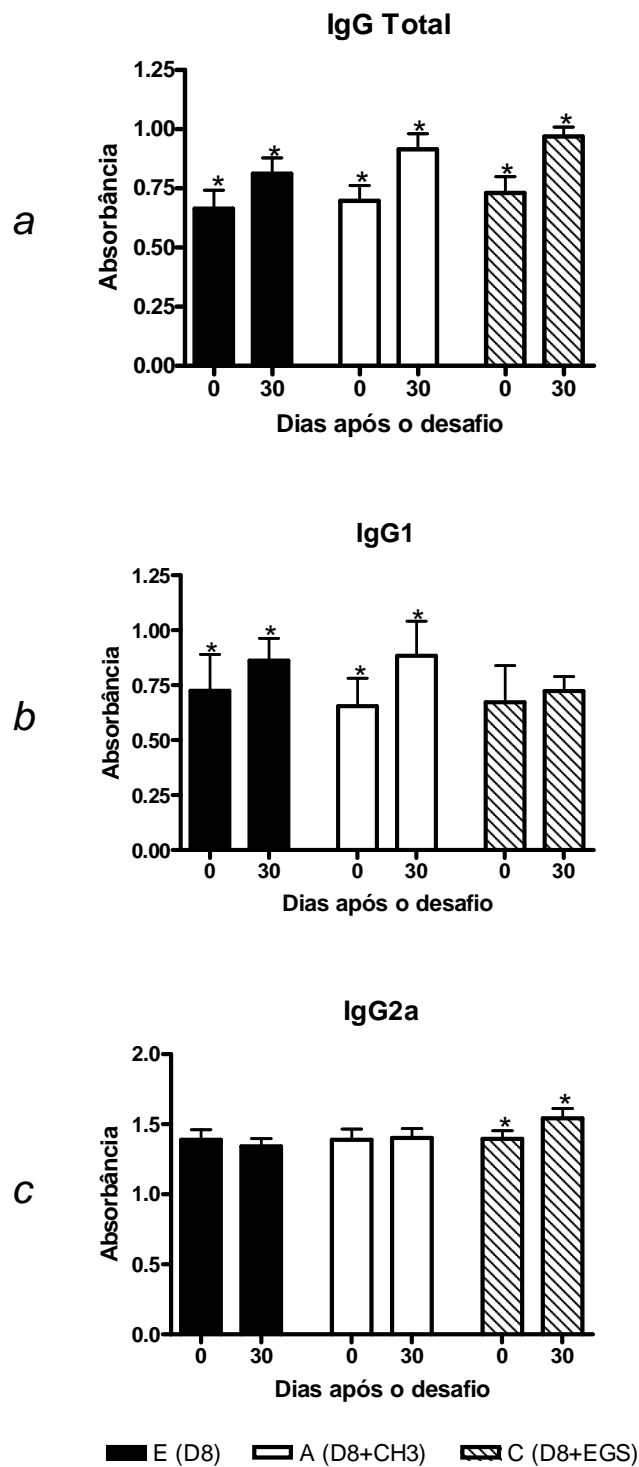


GRÁFICO 5 – Anticorpos específicos anti -*T. gondii* detectados pelo ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepas CH3 e EGS. a- IgG Total, b- IgG1 e c- IgG2a. * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

5.3.2- Anticorpos IgM e IgA em camundongos imunocompetentes desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa D8

Os níveis de anticorpos IgM anti - *T.gondii* dosados no plasma dos animais primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas CH3 (grupo A) e EGS (grupo C) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no dia 30 em relação ao dia zero (GRAF. 6 a). Somente os camundongos primo infectados com a cepa D8 e desafiados com a cepa EGS (grupo C) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da absorvância para anticorpos IgA do dia 0 para o dia 30 (GRAF. 6 b).

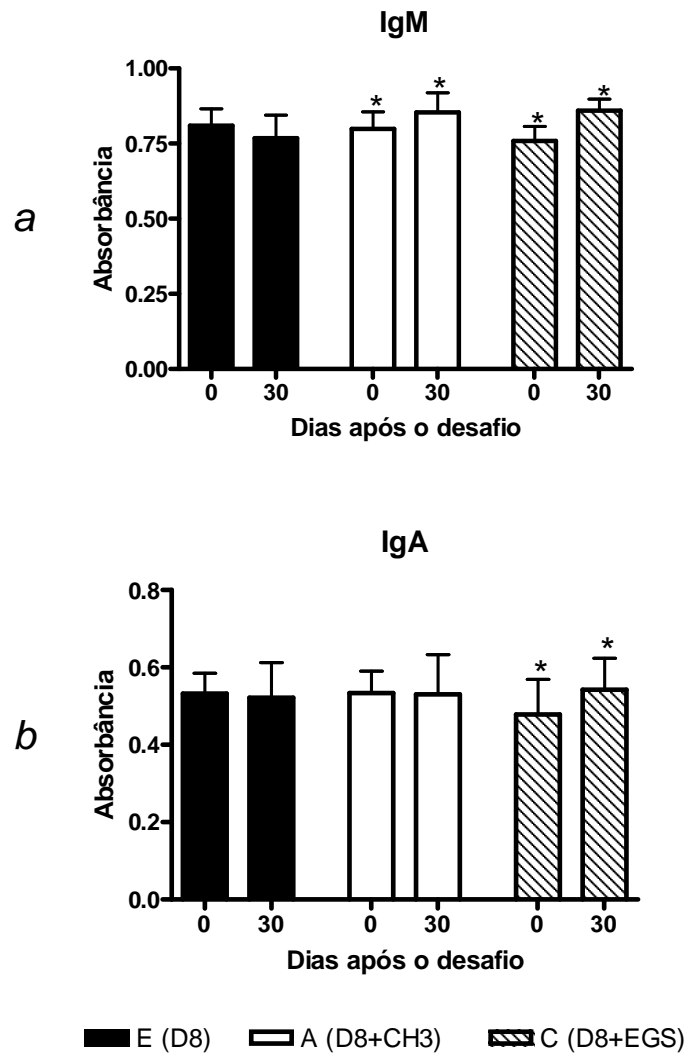


GRÁFICO 6 – Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepas CH3 e EGS. a- IgM e b- IgA. * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

5.3.3- Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa D8

Os níveis de anticorpos IgG total, expressos como valores em absorbância, dosados no plasma dos camundongos infectados com a cepa D8 e imunossuprimidos com Cy (grupo F) e no plasma de camundongos primo infectados com D8, imunossuprimidos e desafiados com a cepa CH3 (grupo B) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no trigésimo dia em relação ao dia zero. No entanto, os níveis de anticorpos dos animais desafiados com EGS (grupo D) apresentaram um discreto decréscimo no dia 30, porém não estatisticamente significativo ($p > 0,05$) (GRAF. 7 a). Em relação a IgG1, tanto os camundongos imunossuprimidos e desafiados com a cepa CH3 (grupo B) como os imunossuprimidos e desafiados com a cepa EGS (grupo D) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da absorbância no dia 30 em relação ao 0. Contudo, o grupo controle infectado somente com D8 e imunossuprimido (grupo F) também apresentou um aumento semelhante de absorbância (GRAF. 7 b). Os camundongos infectados com D8 e imunossuprimidos (grupo F) apresentaram uma redução significativa nos níveis de anticorpos IgG2a no 30º dia, enquanto que os camundongos desafiados (grupos B e D) não apresentaram alteração (GRAF. 7 c).

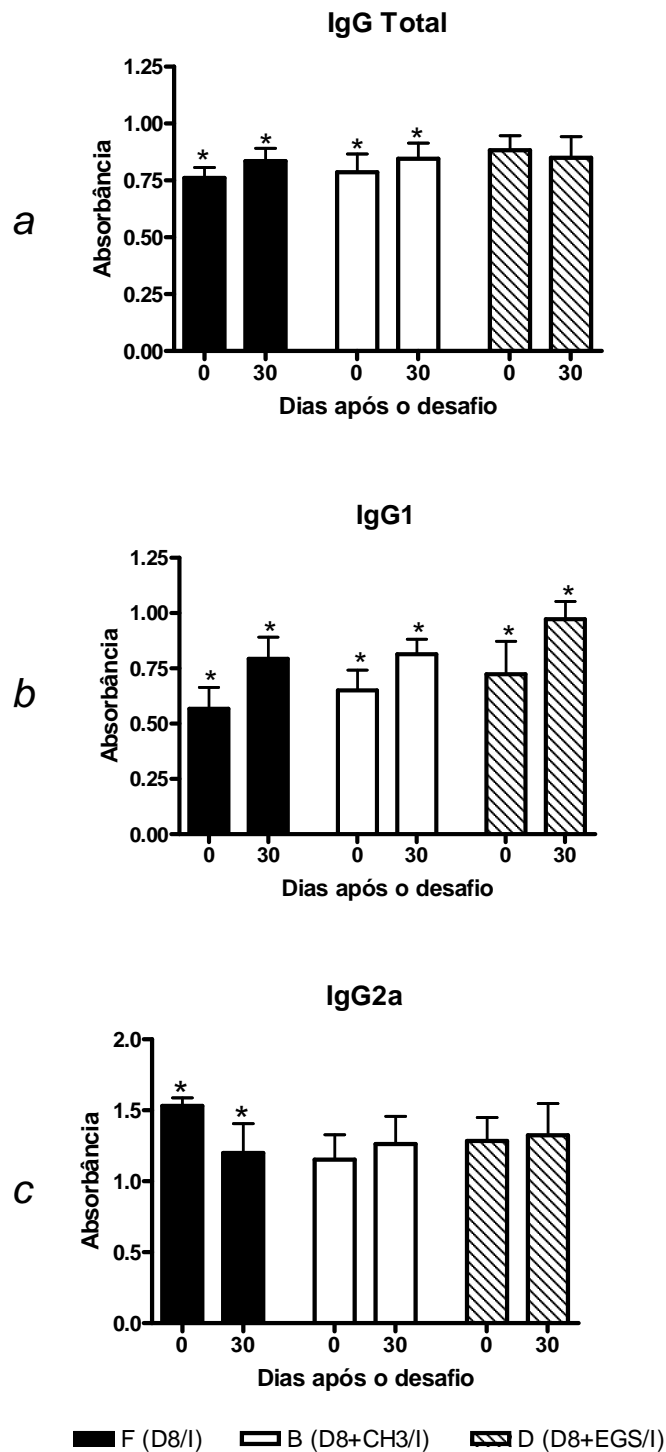


GRÁFICO 7 – Anticorpos específicos anti -*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos com ciclofosfamida e desafiados com as cepas CH3 e EGS. a- IgG Total, b- IgG1 e c- IgG2a. * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

5.3.4- Anticorpos IgM e IgA em camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa D8

Os níveis de anticorpos IgM e IgA anti - *T.gondii* dosados no plasma dos animais primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos e desafiados com as cepas CH3 (grupo B) e EGS (grupo D) apresentaram um decréscimo no 30º dia em relação ao dia zero. No entanto, o grupo controle infectado somente com a cepa D8 e imunossuprimido também apresentou um decréscimo semelhante nos níveis desses anticorpos (GRAF. 8 a e b).

5.3.5- Anticorpos IgM e IgA 30 dias após o desafio com as cepas CH3 e EGS em camundongos primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos ou não pela Cy

Trinta dias após o desafio, os níveis de anticorpos IgM e IgA anti - *T.gondii* dosados no plasma dos animais primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos com Cy e desafiados com as cepas CH3 (grupo B) e EGS (grupo D) foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os níveis de anticorpos dosados no plasma dos camundongos imunocompetentes desafiados por essas cepas (grupos A e C, respectivamente) (GRÁF. 9).

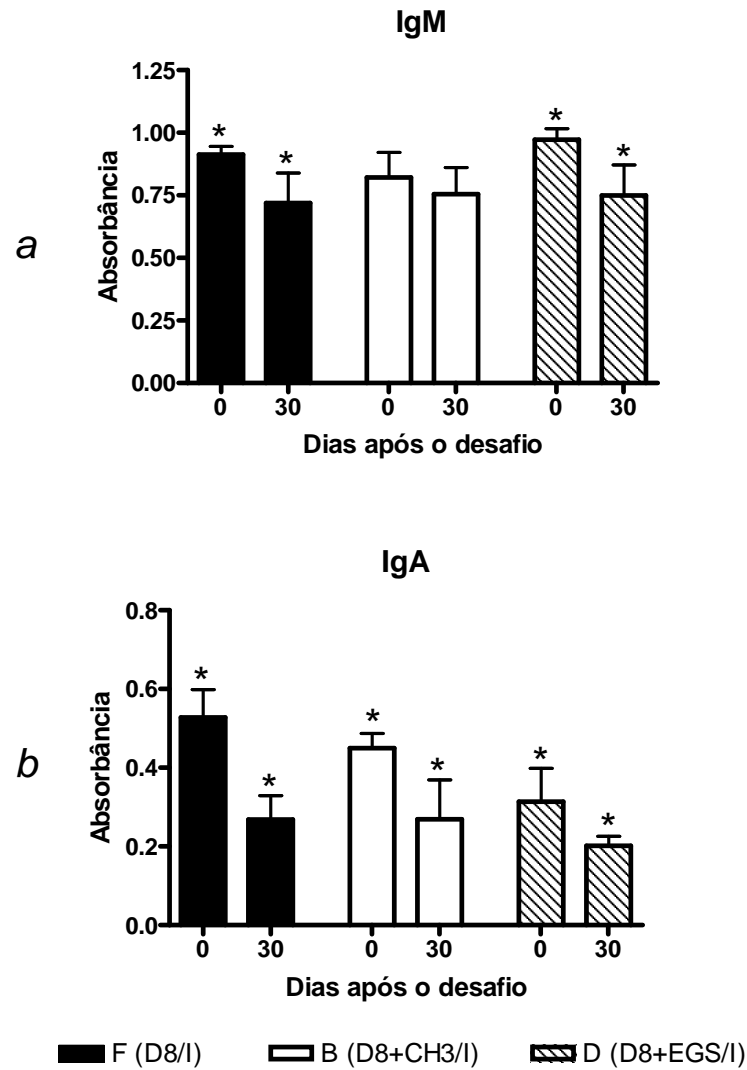


GRÁFICO 8 – Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos com ciclofosfamida e desafiados com as cepas CH3 e EGS. *a*- IgM e *b*- IgA. * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

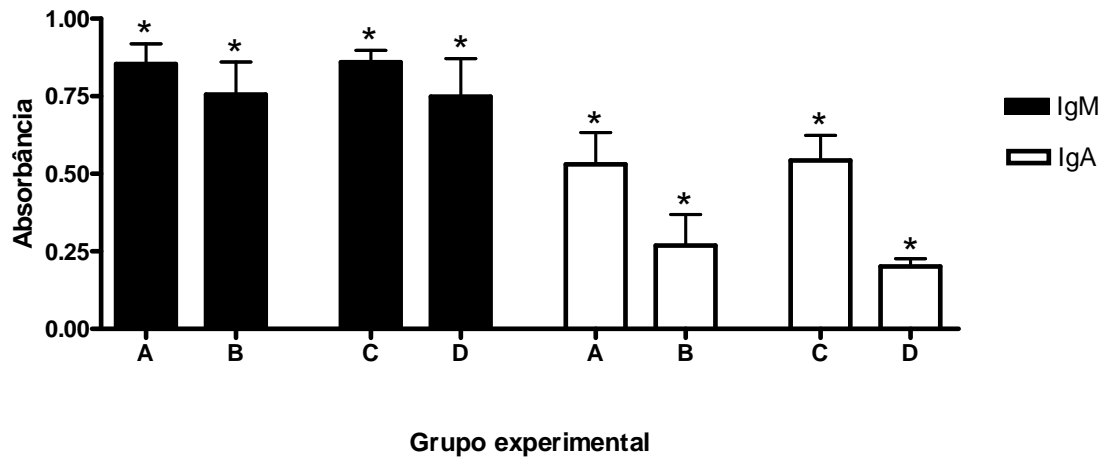


GRÁFICO 9 - Anticorpos IgM e IgA anti-*T. gondii* detectados pelo ELISA em plasma de camundongos BALB/c imunocompetentes primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas CH3 e EGS comparados com camundongos primo infectados com D8, imunossuprimidos com Cy e desafiados com as cepas CH3 e EGS. Grupos experimentais: A (D8+CH3), B (D8+CH3/I), C (D8+EGS) e D (D8+EGS/I). * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado trinta dias após o desafio, de camundongos com e sem imunossupressão.

5.4- Anticorpos anti-*T. gondii*, avaliados pelo método de ELISA, em camundongos BALB/c primo infectados com a cepa ME49, imunossuprimidos ou não pela Cy, e desafiados com as cepas CH3 e EGS

5.4.1- Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos imunocompetentes desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa ME49

Os níveis de anticorpos IgG total anti - *T.gondii* dosados no plasma dos animais primo infectados com ME49 e desafiados com CH3 (grupo J) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no 30º dia em relação ao dia zero. No entanto, o grupo controle infectado somente com ME49 (grupo N) também apresentou aumento significativo nos níveis desses anticorpos, enquanto os animais desafiados com EGS (grupo L) apresentaram um aumento discreto ($p > 0,05$) (GRÁF. 10 a).

Tanto os camundongos infectados somente com ME49 (grupo N) como os desafiados com CH3 (grupo J) apresentaram um aumento da absorbância para IgG1 no dia 30, porém a diferença foi significativa ($p < 0,05$) somente no grupo desafiado. Por outro lado, os camundongos desafiados com EGS (grupo L) apresentaram um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da absorbância para IgG1 no 30º dia em relação ao dia zero (GRÁF. 10 b). Não houve alteração significativa nos níveis de anticorpos IgG2a no 30º dia em nenhum dos grupos analisados (GRÁF. 10 c).

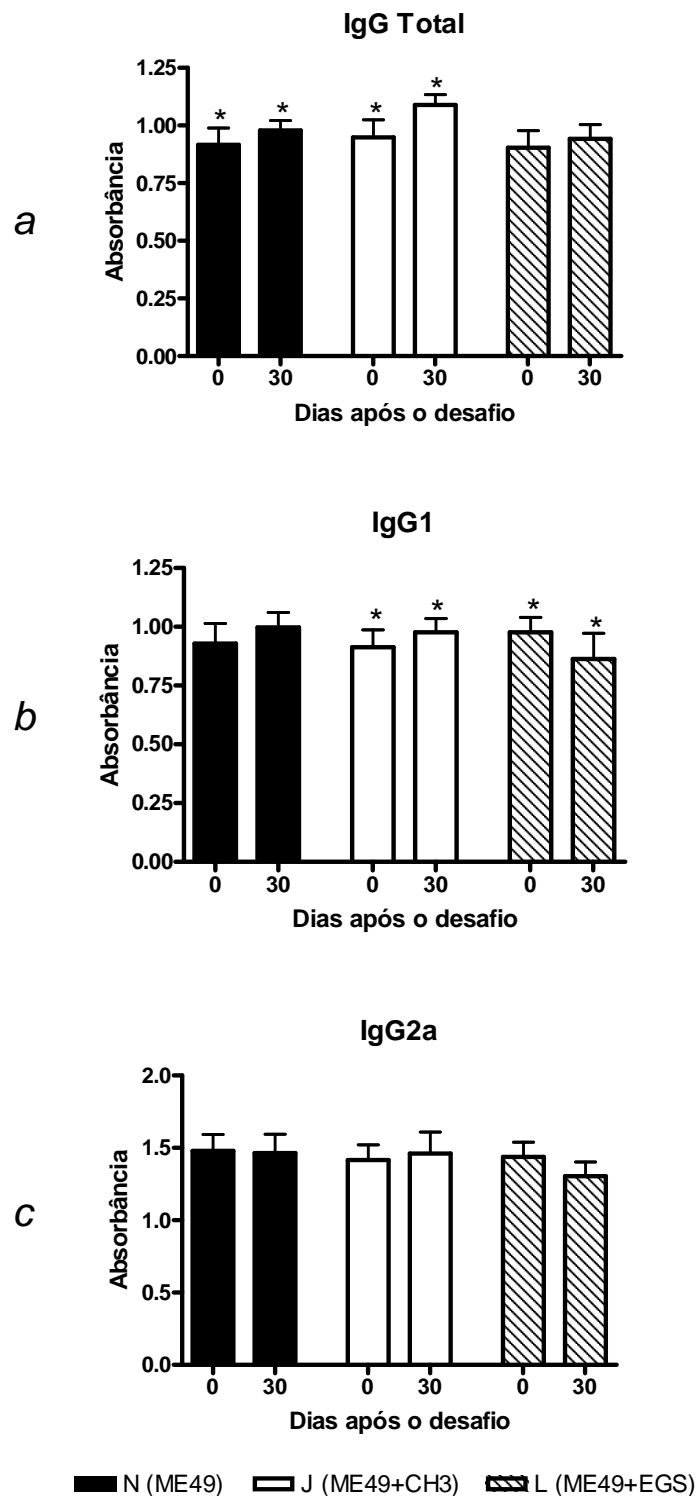


GRÁFICO 10 – Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa ME49 e desafiados após 45 dias com as cepas CH3 e EGS. a- IgG Total, b- IgG1 e c- IgG2a. * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

5.4.2- Anticorpos IgM e IgA em camundongos imunocompetentes desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa ME49

Os níveis de anticorpos IgM e IgA anti- *T.gondii* dosados no plasma dos animais primo infectados com ME49 e desafiados com CH3 (grupo J) e EGS (grupo L) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no dia 30 em relação ao dia zero. O grupo controle infectado somente com ME49 não apresentou alterações significativas nos níveis desses anticorpos (GRAF. 11 a e b).

5.4.3- Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa ME49

Os níveis de anticorpos IgG total e IgG2a no plasma dos camundongos primo infectados com ME49, imunossuprimidos com Cy e desafiados com CH3 (grupo K) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no 30º dia em relação ao dia zero. Não foi observada alteração no nível dessas imunoglobulinas nos controles infectados somente com ME49 (grupo O) (GRÁF. 12 a e c). Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da absorvância no dia 30 para IgG1 em camundongos infectados com ME49, imunossuprimidos com Cy e desafiados com a cepa CH3 (grupo K), mas que ocorreu também em camundongos apenas primo infectados com ME49 e imunossuprimidos (grupo O) (GRÁF. 12 b). Não foi possível comparar os níveis de anticorpos em camundongos imunossuprimidos e desafiados com EGS (grupo M), pois no dia 30 não houve sobreviventes para coleta do plasma.

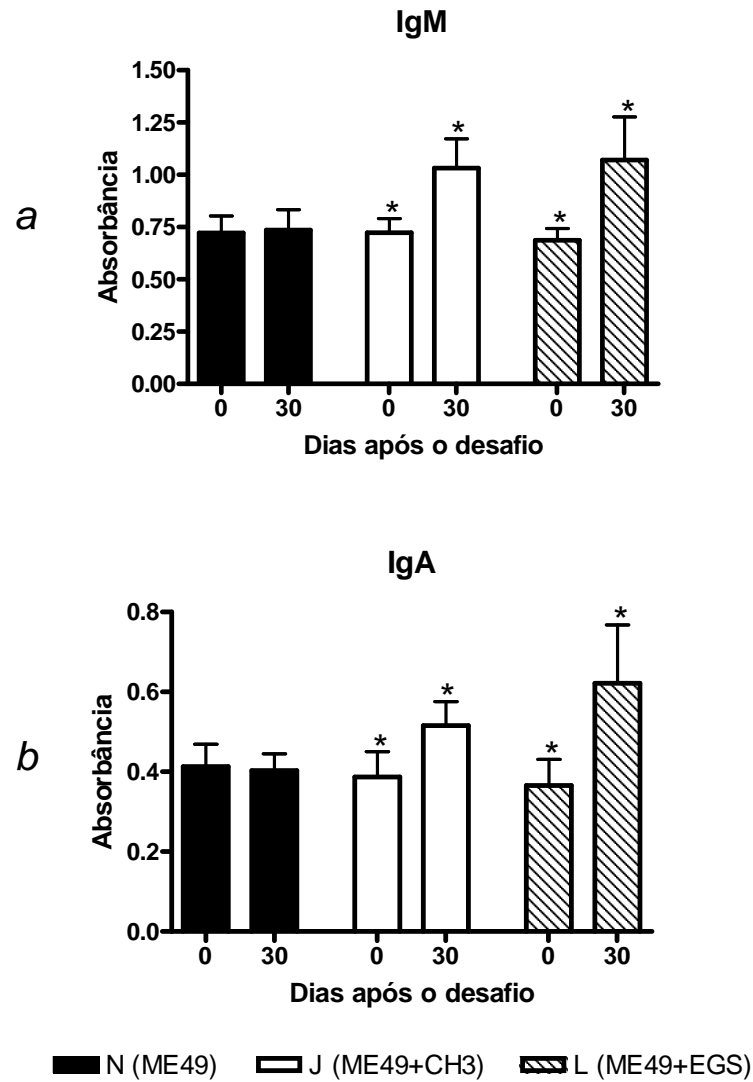


GRÁFICO 11 – Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa ME49 e desafiados após 45 dias com as cepas CH3 e EGS. *a*- IgM e *b*- IgA. * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

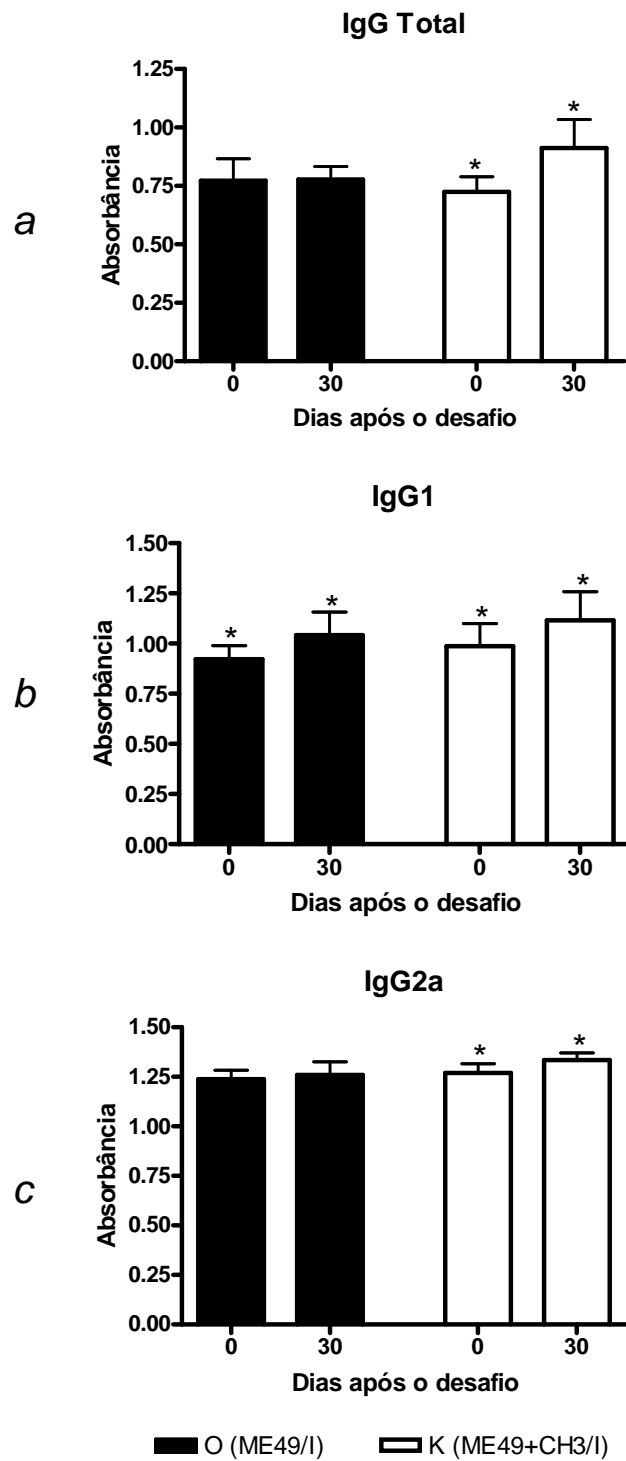


GRÁFICO 12 – Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa ME49, imunossuprimidos com ciclofosfamida e desafiados com a cepa CH3. *a*- IgG Total, *b*- IgG1 e *c*- IgG2a. * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

5.4.4- Anticorpos IgM e IgA em camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados após 45 dias de infecção primária com a cepa ME49

Trinta dias após o desafio, ocorreu uma queda significativa ($p < 0,05$) nos níveis de anticorpos IgM anti- *T.gondii* dosados no plasma dos animais primo infectados com ME49 e imunossuprimidos com Cy (grupo O). Por outro lado, não houve alterações significativas nos níveis de IgM em camundongos imunossuprimidos desafiados com CH3 (grupo K) (GRÁF. 13 a). Os dois grupos em questão (grupo O e K) apresentaram um decréscimo nos níveis de anticorpos IgA. Contudo, esta queda não foi significativa ($p > 0,05$) (GRÁF. 13 b).

5.4.5- Anticorpos IgM e IgA 30 dias após o desafio com a cepa CH3 em camundongos primo infectados com a cepa ME49, imunossuprimidos ou não pela Cy

Trinta dias após o desafio, os níveis de anticorpos IgM e IgA anti- *T.gondii* dosados no plasma dos animais primo infectados com ME49, imunossuprimidos com Cy e desafiados com CH3 (grupo K) foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os níveis de anticorpos dosados no plasma dos camundongos imunocompetentes desafiados com essa cepa (grupo J) (GRÁF. 14).

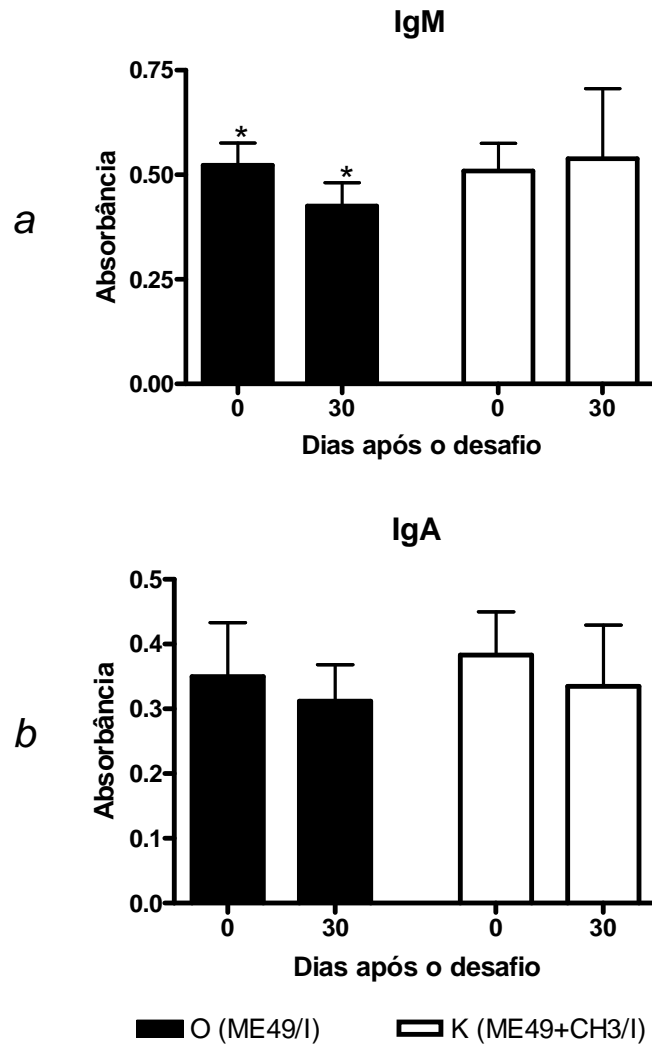


GRÁFICO 13 – Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa ME49, imunossuprimidos com ciclofosfamida e desafiados com a cepa CH3. *a*- IgM e *b*- IgA. * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

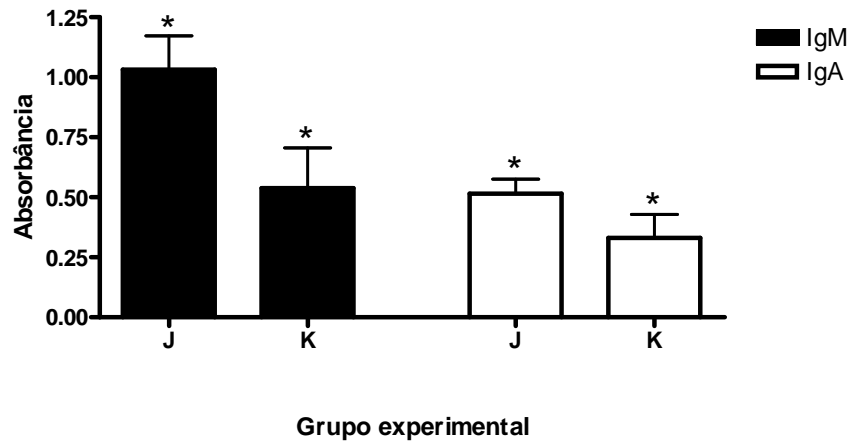


GRÁFICO 14 – Anticorpos IgM e IgA anti-*T. gondii* detectados pelo ELISA em plasma de camundongos BALB/c imunocompetentes primo infectados com a cepa ME49 e desafiados com a cepa CH3 (J: ME49+CH3) comparados com camundongos primo infectados com ME49, imunossuprimidos com Cy e desafiados com a cepa CH3 (K: ME49+CH3/I). * - $p < 0,05$ na comparação entre plasma coletado trinta dias após o desafio, em camundongos com e sem imunossupressão.

5.5- Leucograma

Em todas as quatro coletas de sangue, os camundongos sem infecção ou primoinfectados em fase crônica recente da toxoplasmose e imunossuprimidos por Cy (D8/I, ME49/I e Normais/I) apresentaram um número de leucócitos totais circulantes significativamente menor ($p < 0,05$) que seus respectivos grupos controles não imunossuprimidos (D8, ME49 e Normais) (TAB. 5 e GRAF. 15).

Na contagem diferencial de leucócitos, houve uma diminuição no número médio de neutrófilos, linfócitos e monócitos nos grupos imunossuprimidos (D8/I, ME49/I e Normais/I) quando comparados aos não imunossuprimidos (D8, ME49 e Normais), em todas as coletas realizadas, com exceção do número de neutrófilos encontrados em camundongos infectados com ME49 e imunossuprimidos, na quarta coleta (TAB. 5). Contudo, a análise estatística demonstrou que somente a diminuição no número de neutrófilos e linfócitos no grupo D8/I (2^a, 3^a e 4^a coletas), no grupo ME49/I (1^a coleta) e no grupo Normais/I (1^a coleta), além da diminuição no número de linfócitos no grupo ME49/I (4^a coleta) foram significativas ($p < 0,05$) (TAB. 5).

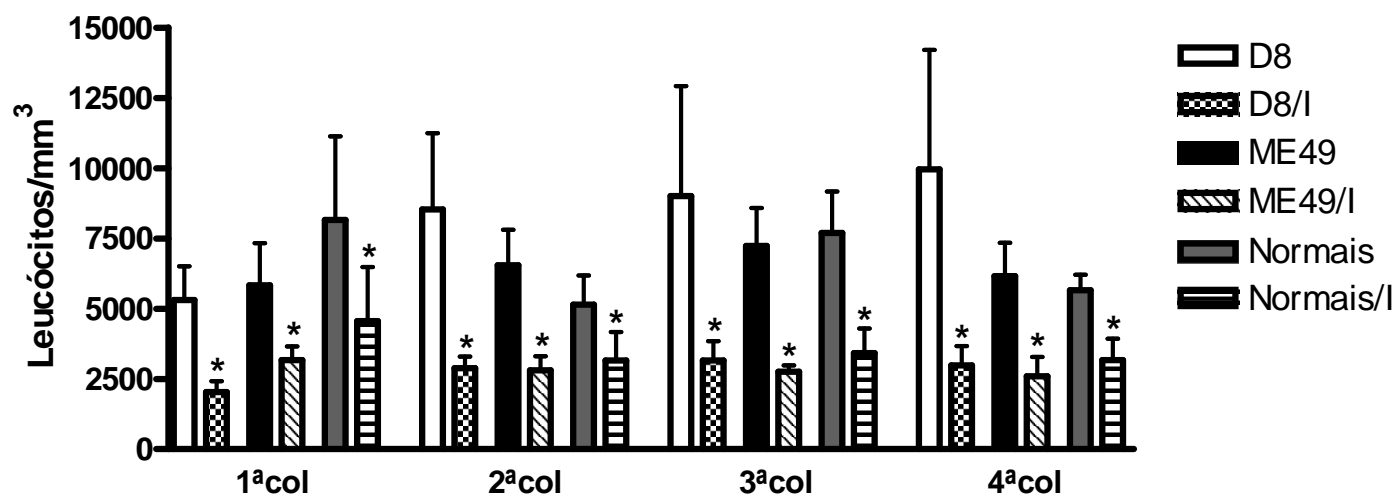


GRÁFICO 15 – Média e desvio padrão do número de leucócitos totais circulantes no sangue obtido em quatro coletas (com 45, 55, 65 e 75 dias de infecção, respectivamente) de camundongos cronicamente infectados ou não com as cepas D8 e ME49 de *T. gondii* e imunossuprimidos com Cy. Grupos controles não imunossuprimidos: D8, ME49 e Normais (sem infecção). * - diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle não imunossuprimido (p < 0,05).

6- DISCUSSÃO

As taxas de mortalidade obtidas pela infecção de camundongos BALB/c com as cepas D8, CH3 e EGS de *T. gondii* estão de acordo com resultados encontrados em estudo anterior. A cepa D8 é considerada de baixa virulência para camundongos, pois é capaz de causar infecção crônica, sem mortalidade por 30 dias, em animais inoculados com até 10^3 taquizoítos pela via intraperitoneal, ou seja, sua dose letal de 100% (DL_{100}) é ≥ 1000 taquizoítos. As cepas CH3 e EGS são consideradas virulentas para camundongos e causam 100% de mortalidade antes de 30 dias de infecção. Contudo, a cepa CH3 possui $DL_{100} > 10$ taquizoítos, enquanto que a cepa EGS possui uma $DL_{100} = 1$ taquizoíto (HOWE *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006). No presente estudo, quando camundongos foram inoculados com a cepa D8 todos os animais permaneceram vivos durante o período de acompanhamento, enquanto que todos os camundongos inoculados com as cepas CH3 e EGS morreram antes de 15 dias de infecção.

Quando a infecção pelas cepas CH3 e EGS foi precedida pela infecção primária com a cepa D8 todos os animais sobreviveram, sugerindo que a infecção com a cepa D8 foi capaz de incitar uma resposta imune adaptativa que protegeu os animais contra a cepa virulenta utilizada no desafio. As taxas de mortalidade encontradas no presente estudo confirmam os resultados que obtivemos em um estudo anterior, quando realizamos a infecção primária com a cepa D8 e, após 45 dias, o desafio com as cepas CH3 ou EGS (BRANDÃO *et al.*, 2009).

O bioensaio dos camundongos primo infectados com D8 e desafiados com CH3 não foi sugestivo de reinfecção, tendo em vista que nenhum dos animais que

receberam os cistos provenientes desse grupo morreu. Esse fato pode indicar a ausência da cepa virulenta CH3 no cérebro dos animais desafiados. A PCR-RFLP demonstrou a existência somente da cepa D8 no cérebro dos animais desse grupo experimental, comprovando que não houve reinfecção pela CH3. Nesse caso, o bioensaio e a PCR-RFLP mostraram resultados totalmente coerentes.

Dao *et al.* (2001) verificaram que não ocorre reinfecção em camundongos primo infectados com a cepa 76K e desafiados com a cepa Prußgal (ambas classificadas como tipo II). No entanto, eles observaram a ocorrência de reinfecção em camundongos que receberam a infecção primária com a cepa Prußgal e o desafio com a cepa Ned (tipo III), e conseguiram demonstrar a coexistência dessas duas cepas no cérebro desses animais. Os autores sugeriram que, no modelo experimental murino, não ocorre reinfecção quando são utilizadas cepas pertencentes ao mesmo genótipo, e que a reinfecção só irá ocorrer quando forem utilizadas cepas de genótipo diferente. Os resultados obtidos no estudo atual corroboram a hipótese desses autores, tendo em vista que o bioensaio e a PCR-RFLP confirmaram a ocorrência de reinfecção pela cepa EGS nos animais previamente infectados pela cepa D8 (ambas pertencentes ao genótipo recombinante I/III, porém geneticamente diferentes) e a coexistência dessas duas cepas no cérebro desses animais. Contudo, a PCR-RFLP foi bem mais sensível que o bioensaio para confirmar a reinfecção nesses animais, tendo em vista que o bioensaio sugeriu reinfecção em apenas um de dez animais e a PCR-RFLP demonstrou que 9/10 animais se reinfecaram. A morte do animal no bioensaio sugere a presença da cepa virulenta que foi utilizada no desafio dos animais experimentais, conforme critérios descritos por Brandão *et al.* (2009), nesse caso, a cepa EGS.

Os resultados obtidos sugerem que a resposta imune conferida pela infecção primária com a cepa D8 foi capaz de proteger os camundongos contra a reinfecção com a cepa CH3. No entanto, não foi capaz de proteger os camundongos contra a reinfecção com a cepa EGS, já que 90% dos animais se reinfectaram. Contudo, como já discutido anteriormente, a resposta imunológica contra o *T. gondii* previamente estabelecida foi capaz de prevenir a mortalidade causada pela cepa virulenta utilizada no desafio. Esses resultados corroboram o estudo de Dzitko *et al.* (2006) que, estudando a reinfecção em modelos experimentais, verificaram que camundongos desafiados com uma dose letal de uma cepa virulenta após a primo infecção com cepa tipo II desenvolveram uma forte resposta imune adaptativa capaz de impedir a morte do hospedeiro, mas não de impedir a reinfecção. Estudos anteriores demonstraram que, apesar das três cepas serem recombinantes I/III, a cepa D8 possui um maior número de alelos semelhantes com a cepa CH3 do que com a cepa EGS (FERREIRA *et al.*, 2006) e, portanto, a maior diferença genotípica entre D8 e EGS pode ter favorecido a reinfecção (BRANDÃO *et al.*, 2009).

Araújo *et al.* (1997) sugeriram que casos de sintomatologia aguda em indivíduos em fase crônica da toxoplasmose podem ser devido à reinfecção pelo *T. gondii*, principalmente quando há um comprometimento do sistema imune nesses indivíduos, seja por doenças ou pelo uso de drogas imunossupressoras. O *T. gondii* possui ampla distribuição mundial (TENTER *et al.*, 2000), sua prevalência na população humana é alta (DUBEY & BEATTIE, 1988) e o uso de drogas imunossupressoras tem se tornado cada vez mais comum, seja para o tratamento de doenças auto-imunes, neoplasias ou prevenção de rejeição a transplantes (ALLISON, 2000). Por isso, decidimos verificar se a imunossupressão pela ciclofosfamida (Cy) em camundongos na fase crônica da toxoplasmose aumentaria

as chances de reinfeção por outra cepa de *T. gondii*. A escolha da Cy baseou-se na literatura, tendo em vista que a droga tem sido utilizada para causar imunossupressão em modelos experimentais e possui características farmacológicas favoráveis a essa finalidade (STENDER *et al.*, 1959; WILLERS & SLUIS, 1975; ROLLINGHOFF *et al.*, 1977; HAFIZI & MODABBER, 1978; SHAND *et al.*, 1979; TURK & PARKER, 1979; DOHERTY, 1981; HOFFLIN *et al.*, 1987; JONES *et al.*, 1987; TARAYRE *et al.*, 1990; KHALIFA *et al.*, 2000; ALLISON, 2000; GARCIA *et al.*, 2004; EMADI *et al.*, 2009). Baseou-se ainda na facilidade de aquisição no mercado à um custo razoavelmente acessível, e no fato de que esse fármaco ainda é muito empregado no tratamento das doenças humanas anteriormente citadas (ALLISON, 2000; GARCIA *et al.*, 2004; EMADI *et al.*, 2009).

A Cy, quando administrada na dosagem escolhida (KHALIFA *et al.*, 2000) e em animais não infectados, não possuiu efeitos tóxicos que pudessem levar os camundongos à morte, o que ficou evidenciado pela sobrevivência de todos os animais não infectados que foram imunossuprimidos. Todos os camundongos primo infectados com D8 e imunossuprimidos também sobreviveram durante os 30 dias de acompanhamento, sugerindo que a droga não foi capaz de reativar a infecção crônica recente e levar os animais à morte.

É importante ressaltar que não houve diferença estatística entre o número de cistos cerebrais encontrados nos animais infectados somente com a cepa D8 e o número de cistos no cérebro dos animais infectados por essa cepa e posteriormente imunossuprimidos por Cy. O mesmo foi observado durante a comparação entre cistos dos animais infectados com a cepa ME49 e os animais infectados por essa cepa e imunossuprimidos. Isso reforça a hipótese de que a imunossupressão causada pela droga não foi capaz de reativar a infecção crônica e

consequentemente promover o surgimento de novos cistos teciduais (GAZZINELLI *et al.*, 1992), o que pode ocorrer com o uso de determinadas drogas imunossupressoras, como acetato de cortisona, ciclosporina (HOFFLIN *et al.*, 1987) e dexametasona (ODAERT *et al.*, 1996).

Ocorreu um aumento significativo no número de cistos cerebrais dos camundongos primo infectados com a cepa D8, imunossuprimidos e posteriormente desafiados com CH3 em relação aos animais infectados somente com D8 e imunossuprimidos, o que poderia indicar a ocorrência de reinfecção nesses animais. No entanto, a imunossupressão pela Cy não foi capaz de promover a reinfecção pela cepa CH3 nos animais previamente infectados pela cepa D8, e esses resultados foram confirmados pelo bioensaio e pela PCR-RFLP, que demonstraram que nenhum animal se reinfectou. A PCR-RFLP feita com o material obtido desses cistos só demonstrou a presença da banda característica da cepa D8. Portanto, algum fator não avaliado neste trabalho promoveu um aumento no número de cistos da cepa D8 no cérebro dos animais que receberam Cy e foram desafiados com a cepa CH3. Esses resultados sugerem que o aumento no número de cistos cerebrais nem sempre é um bom indicativo de que ocorreu a reinfecção com o estabelecimento da cepa utilizada no desafio no cérebro dos animais. Apesar da imunossupressão com a Cy, a semelhança genotípica entre as cepas D8 e CH3 (FERREIRA *et al.*, 2006) provavelmente foi um fator determinante para que a imunidade adaptativa previamente estabelecida pela infecção primária com a cepa D8 conferisse proteção contra a reinfecção pela cepa CH3.

Conforme discutido anteriormente, a PCR-RFLP demonstrou reinfecção em 90% dos animais imunocompetentes desafiados com EGS 45 dias após a infecção primária com D8, e, apesar disso, todos os animais desse grupo experimental

sobreviveram ao desafio. Quando o tratamento com a Cy precedeu o desafio com a cepa EGS, a sobrevivência caiu para 40%, mostrando que a droga aumentou a suscetibilidade dos camundongos à reinfecção, comprometendo a proteção conferida pela resposta imune previamente estabelecida pela da infecção primária com a cepa D8. Esse resultado já era esperado tendo em vista que a Cy é considerada potente imunodepressor capaz de inibir tanto a resposta imune humoral quanto a celular (SHAND, 1979; TURK & PARKER, 1979; GARCIA *et al.*, 2004; ALLISON, 2000). No entanto, são necessários estudos adicionais para verificar quais aspectos da imunossupressão, interferência na resposta imune humoral ou celular, foram determinantes para o aumento da suscetibilidade do hospedeiro a reinfecção.

Por outro lado, Matar *et al.* (2001) relataram que quando ratos portadores de linfomas com 14 dias de evolução são tratados com uma baixa dose de Cy, ocorre uma diminuição da produção de IL-10 por células do baço, especialmente pelos linfócitos T. Os autores também relataram uma diminuição da produção de TGF- β por linfócitos T e macrófagos oriundos do baço desses animais. Sabe-se que IL-10 é uma citocina regulatória que diminui drasticamente a resposta mediada por células Th1 (HOWARD & O'GARRA, 1992). IL-10 inibe a síntese IL-12 e TNF- α por células acessórias, inibe a ativação de macrófagos, inibe a produção de IFN- γ pelas células T e células NK, e previne a diferenciação de clones Th1 (D'ANDREA *et al.*, 1993), e portanto, na toxoplasmose aguda, essa citocina é de extrema importância para evitar a super-inflamação, em resposta a infecção, que poderia prejudicar o hospedeiro levando-o à morte (NEYER *et al.*, 1997). TGF- β é considerada uma citocina antiinflamatória que tem papel importante na regulação da resposta imune e está relacionada ao perfil de resposta Th2, auxiliando no balanço entre as resposta

Th1/Th2 (LETTERIO & ROBERTS, 1998). Apesar da dosagem de Cy utilizada no presente estudo ser um pouco maior que a dosagem utilizada em ratos por Matar *et al.* (2001), existe a possibilidade de que os camundongos imunossuprimidos apresentassem a síntese de IL-10 e TGF- β reduzidas no momento do desafio. A possível diminuição dos níveis dessas citocinas proporcionada pelo tratamento com Cy poderia levar, em último instante, à exacerbação da resposta inflamatória Th1 e ao conseqüente aumento da patologia, levando ao aumento de mortalidade nos camundongos tratados e desafiados, quando comparados com os não imunossuprimidos. Portanto, são necessárias investigações adicionais, dentre elas, dosagem de citocinas, para verificar qual o fator foi de fato responsável pelo aumento da suscetibilidade ao desafio e mortalidade dos camundongos imunossuprimidos com Cy: o comprometimento da resposta imune previamente estabelecida pela da infecção primária ou a exacerbação da resposta inflamatória.

Dos 4 animais que sobreviveram, o bioensaio mostrou que um havia se reinfectado. Já a PCR-RFLP mostrou a coexistência das cepas D8 e EGS no cérebro de dois desses animais, sendo que mais uma vez esse método foi mais sensível para confirmar a reinfecção. A análise estatística do número de cistos no cérebro dos animais sobreviventes desse grupo revelou que camundongos primo infectados com D8, imunossuprimidos com Cy e posteriormente desafiados com EGS apresentaram quantidade significativamente maior de cistos que os animais imunocompetentes desafiados com EGS. Houve reinfecção em quase todos os camundongos nos dois grupos experimentais, imunossuprimidos e não imunossuprimidos, mas ao que tudo indica, a imunossupressão prévia pela Cy favoreceu a formação de um número maior de cistos teciduais no cérebro dos animais.

Hofflin *et al.* (1987), na tentativa de estabelecer um modelo murino de encefalite causada pelo *T. gondii*, trataram camundongos com Cy dois dias antes da infecção intracerebral com taquizoítos e administraram Cy em doses de manutenção a cada cinco dias. Após 14 dias de infecção, os autores verificaram a presença de muitos cistos cerebrais e grupos de cistos nos animais tratados com Cy, o que não foi observado em camundongos que haviam sido tratados com acetato de cortisona e ciclosporina, nos quais havia um predomínio de taquizoítos. Segundo os autores, a formação de cistos nos animais imunossuprimidos com Cy se deve ao fato de que o sistema imune do hospedeiro foi intermitentemente capaz de produzir o sinal que estimula a formação de cistos teciduais, tendo em vista que pode ter ocorrido a diminuição da imunossupressão nos intervalos entre as injeções da droga. Sob essas circunstâncias, períodos de proliferação de taquizoítos poderiam se alternar com períodos de formação de cistos e, conseqüentemente, com a formação de agrupamentos de cistos no cérebro dos animais. A Cy, no presente trabalho, foi administrada em intervalos maiores, a cada 7 dias até o final do experimento, iniciando 5 dias antes do desafio com a EGS. Provavelmente a resposta imune do hospedeiro ao desafio também sofreu oscilações entre os períodos de administração da droga, o que poderia ter contribuído para o estabelecimento da infecção e a formação de cistos da cepa EGS no cérebro dos animais que se reinfectaram após a primo infecção com D8 e imunossupressão com Cy. Outro fator que contribui com essa hipótese é que apenas dois dos quatro animais sobreviventes e que tiveram a reinfecção confirmada pela PCR-RFLP apresentaram um aumento considerável no número de cistos cerebrais. Os outros dois animais que não se reinfectaram apresentaram quantidade de cistos semelhante aos animais imunocompetentes desafiados com EGS. Contudo, a metodologia utilizada não permite afirmar se os

cistos adicionais que se formaram nos animais imunossuprimidos são realmente correspondentes à cepa EGS que foi utilizada no desafio.

Além de avaliar a reinfecção experimental em camundongos imunossuprimidos pela Cy, outra proposta desse estudo foi verificar se as diferenças genóticas poderiam influenciar na ocorrência de reinfecção por cepas recombinantes de *T. gondii*. Estudos realizados por Araújo *et al.* (1997), Dao *et al.* (2001) e Dzitko *et al.* (2006) mostraram a importância das diferenças genóticas no processo de reinfecção, sugerindo que a proteção imune contra a reinfecção está relacionada ao genótipo do *T. gondii*. Por outro lado, Freyre *et al.* (2004) concluíram que não há relação entre proteção e genótipo das cepas utilizadas já que a infecção primária com a cepa BK (tipo I) foi capaz de conferir proteção contra reinfecção com algumas cepas tipo II (C, Prugniaud e ME49), mas não contra outras cepas do tipo II (Elg, Bear e M3) também utilizadas no desafio. Portanto, ainda não está definido se a proteção imune contra a reinfecção é estritamente genótipo-específica (DZITKO *et al.*, 2006). No presente trabalho, além da infecção primária com a cepa D8 e desafio com as cepas CH3 e EGS (todas recombinantes I/III) foi feita infecção primária com a cepa ME49 (genótipo clonal tipo II) (FERREIRA *et al.*, 2006), seguida ou não de imunossupressão por Cy, e posteriormente o desafio com as cepas CH3 e EGS. Essa metodologia permitiu avaliar o papel do genótipo do parasito na proteção imune do hospedeiro contra a reinfecção e, mais uma vez, verificar se a imunossupressão aumenta as chances de reinfecção.

A cepa ME49, assim como a cepa D8, é considerada de baixa virulência para camundongos BALB/c, pois é capaz de causar infecção crônica em animais inoculados com até 10^3 taquizoítos pela via intraperitoneal (LUNDE & JACOBS, 1983; FERREIRA *et al.*, 2006). Portanto, a ausência de mortalidade encontrada em

animais infectados com a cepa ME49 está de acordo com a literatura. Apenas um camundongo que foi infectado com ME49 e imunossuprimido com Cy morreu. No entanto, como discutido anteriormente, não houve diferença estatística entre o número de cistos encontrados em animais imunossuprimidos e não imunossuprimidos, sugerindo que a Cy não foi capaz de reativar a infecção crônica e consequentemente promover o surgimento de novos cistos teciduais nos animais primo infectados com ME49. Entre os sete camundongos do bioensaio que foram inoculados com cistos provenientes de camundongos infectados com ME49 e imunossuprimidos, um camundongo não sobreviveu. Esse animal morreu aos 29 dias de acompanhamento, ou seja, um dia antes de terminar o experimento do bioensaio. A coleta de sangue desse animal para obtenção de soro e realização do ELISA ocorreu um dia antes da sua morte e ele apresentou sorologia IgG anti-*T.gondii* positiva semelhante aos demais animais do grupo. A morte desse animal não era esperada tendo em vista que a cepa ME49 é uma cepa avirulenta (LUNDE & JACOBS, 1983; FERREIRA *et al.*, 2006) e que os animais do bioensaio não receberam nenhum tipo de imunossupressão. No entanto, apesar dos camundongos BALB/c serem isogênicos e pertencentes à mesma linhagem, os animais que morreram tanto no experimento quanto no bioensaio, provavelmente responderam de forma diferenciada à infecção pelo *T. gondii*, o que indica que outros fatores individuais podem estar envolvidos na resistência ao parasito.

Quando os camundongos primo infectados com ME49 foram desafiados com CH3, todos sobreviveram e, quando desafiados com EGS, apenas um camundongo morreu. Esses resultados sugerem que, assim como ocorreu com a infecção primária com a cepa D8, a primo infecção com a cepa ME49 desencadeou o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa que protegeu o hospedeiro

contra a cepa virulenta utilizada no desafio. O bioensaio realizado com cistos teciduais provenientes de camundongos que foram primo infectados com ME49 e desafiados com CH3 não foi sugestivo de reinfecção, já que todos os camundongos permaneceram vivos. Por outro lado, a PCR-RFLP continuou sendo mais sensível que o bioensaio, pois conseguiu detectar a coexistência das duas cepas no cérebro de quatro dos nove animais, confirmando a ocorrência de reinfecção. A análise estatística revelou que camundongos primo infectados com ME49 e desafiados com EGS tiveram um aumento significativo no número de cistos cerebrais quando comparados com animais infectados somente com ME49, e esses resultados são sugestivos de reinfecção. O aumento significativo do número de cistos cerebrais após o desafio por outra cepa de *T. gondii* em camundongos imunocompetentes já havia sido relatado por Araújo *et al.* (1997) após realizarem a primo infecção de camundongos com a cepa ME49 (avirulenta) e desafiarem com a cepa C56 (virulenta). Os autores, utilizando o método do bioensaio para determinar a ocorrência de reinfecção, verificaram que a resposta imune conferida pela infecção primária não foi capaz de prevenir a formação de cistos cerebrais referentes à cepa utilizada no desafio. O bioensaio e a PCR-RFLP feitos com o material obtido do cérebro dos animais sobreviventes após a primo infecção com ME49 e desafio com EGS apresentaram resultados totalmente coerentes, pois ambas as metodologias revelaram que todos os camundongos haviam se reinfecado. Portanto, pode-se dizer que, semelhante ao que ocorreu com a cepa D8, a resposta imune adaptativa conferida pela infecção primária com a cepa ME49 também atenuou a mortalidade pelas cepas virulentas CH3 e EGS utilizadas no desafio, mas, no entanto, não foi capaz de evitar a reinfecção com nenhuma das duas cepas, o que corrobora os resultados obtidos por Dzitko *et al.* (2006) e por Araújo *et al.* (1997), já discutidos

anteriormente, e ressalta a importância das diferenças genóticas entre as cepas de *T. gondii* no processo de reinfecção.

Inusitadamente, a PCR-RFLP feita com o material proveniente do cérebro dos camundongos primo infectados com ME49 e desafiados com EGS revelou a existência da banda referente à cepa EGS, porém não detectou a cepa ME49. Certamente esses animais estavam infectados pela ME49, pois o ELISA feito com o soro obtido desses camundongos antes do desafio demonstrou a presença de anticorpos IgG anti-*T.gondii*, confirmando o sucesso da infecção primária. Além disso, nenhum animal sem infecção prévia foi capaz de sobreviver ao desafio com a cepa EGS. Os cistos cerebrais nos camundongos sobreviventes após o desafio com EGS foram tratados com pepsina e inoculados pela via intraperitoneal em camundongos “Swiss” para obtenção de uma massa de taquizoítos após 5-7 dias e posterior análise por PCR-RFLP. Possivelmente, após esse período, havia uma quantidade bem menor de taquizoítos da cepa ME49 do que da cepa EGS no peritônio dos camundongos “Swiss”, tendo em vista que taquizoítos de cepas virulentas possuem uma maior capacidade de invadir células, atravessar barreiras biológicas e de se multiplicar no meio intracelular que os de cepas avirulentas (YANG *et al.*, 1998; BARRAGAN & SIBLEY, 2002). Portanto, a pequena quantidade de parasitos da cepa avirulenta pode ter prejudicado sua detecção por PCR-RFLP, apesar da grande sensibilidade dessa técnica. Conforme discutido anteriormente, esse grupo experimental apresentou um aumento significativo no número de cistos cerebrais após o desafio com EGS, quando comparado com animais infectados somente com ME49. Portanto, existe também a possibilidade de que os camundongos “Swiss” tenham sido inoculados predominantemente com cistos da

cepa EGS, aumentando a quantidade de parasitos dessa cepa e, conseqüentemente, favorecendo sua detecção pela PCR-RFLP.

Elbez-Rubinstein *et al.* (2009), em um estudo realizado na França, isolaram uma cepa de *T. gondii* de um bebê com toxoplasmose congênita. A cepa foi denominada IPP-2002-URB, e apresentou genótipo atípico que não é encontrado na Europa, mas que comumente é descrito na América do Sul. A mãe da criança, antes da gravidez, tinha uma infecção crônica pelo parasito, e provavelmente por cepa tipo II, genótipo muito comum em infecções humanas no local. Portanto, os autores levantaram a hipótese de que a mãe havia se reinfectado durante a gravidez ao comer carne de cavalo crua importada, e conseqüentemente, transmitiu o parasito ao feto. A hipótese de reinfecção foi testada em camundongos, sendo que os autores primeiro infectaram os animais com a cepa PRU (tipo II), e desafiaram com a cepa IPP-2002-URB, confirmando a ocorrência de reinfecção. No presente estudo, os camundongos foram primeiro infectados com cepa tipo II (ME49), muito comum na Europa e Estados Unidos da América (DARDÉ *et al.*, 2004), e desafiados com cepas recombinantes I/III (CH3 e EGS) que foram isoladas no Brasil. A proteção conferida pela cepa ME49 contra reinfecção foi baixa, o que corrobora a hipótese de que a imunidade adquirida contra cepas européias pode não proteger contra a reinfecção por cepas de genótipo diferente, especialmente se ela for atípica (ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009). Como a proteção cruzada conferida por cepas de genótipos diferentes parece ser insuficiente para evitar a reinfecção, existe também a possibilidade de que pessoas cronicamente infectadas por cepas recombinantes brasileiras se reinfectem por cepas de genótipos clonais ao viajarem para o exterior ou ingerirem alimentos importados que estejam contaminados. Contudo, estudos adicionais são necessários para testar essa hipótese.

Quando a imunossupressão pela Cy precedeu o desafio com as cepas CH3 e EGS, em camundongos primo infectados com ME49, a sobrevivência caiu de 100% para 77,8% e de 88,9% para 0%, respectivamente. Esses resultados sugerem que a droga diminuiu a resposta imune previamente estabelecida, comprometendo a proteção contra as cepas virulentas utilizadas no desafio. O bioensaio feito com cistos obtidos dos camundongos imunossuprimidos e desafiados com CH3 mostrou que quatro de sete animais se reinfetaram. Já a PCR-RFLP demonstrou a coexistência das cepas ME49 e CH3 no cérebro de cinco dos sete animais (71,4 %). Como discutido anteriormente, a PCR-RFLP feita com os cistos obtidos dos animais imunocompetentes que foram desafiados com CH3 mostrou uma taxa menor de reinfecção (44,4% dos animais). Portanto, esses dados reforçam a hipótese de que a droga aumentou a suscetibilidade dos camundongos a reinfecção, comprometendo a proteção conferida pela resposta imune previamente estabelecida através da infecção primária com a cepa ME49. Como nenhum dos animais que foi imunossuprimido com Cy e desafiado com EGS sobreviveu, não foi possível realizar o bioensaio ou a PCR-RFLP desse grupo.

Pode-se dizer que a infecção primária com a cepa D8 conferiu ao hospedeiro uma maior proteção contra desafio com as cepas CH3 e EGS do que a infecção primária com a cepa ME49. O fato da cepa CH3 ser capaz de reinfetar camundongos primo infectados com ME49, mas não ser capaz de reinfetar camundongos primo infectados com D8, reforça essa hipótese. As taxas de mortalidade e reinfecção após o desafio com a cepa EGS foram maiores nos camundongos previamente infectados pela cepa ME49 do que nos previamente infectados por D8. A imunossupressão com Cy não alterou a resistência dos camundongos primo infectados com D8 ao desafio com CH3. No entanto, aumentou

as taxas de reinfecção em animais primo infectados por ME49. Além disso, a imunossupressão promoveu a morte de todos os camundongos desafiados com EGS após a primo infecção com ME49, o que não ocorreu quando a primo infecção foi com D8. A menor proteção contra o desafio conferida pela cepa ME49, quando comparada com a cepa D8, provavelmente está relacionada à grande diferença genotípica entre a cepa ME49 (Tipo II) e as cepas CH3 e EGS (recombinantes I/III) (FERREIRA *et al.*, 2006). Esses resultados ressaltam a importância das diferenças genotípicas no processo de reinfecção pelo *T. gondii* (ARAÚJO *et al.*, 1997; DZITKO *et al.*, 2006) e reforçam a hipótese de que a infecção primária com cepa Tipo II não protege contra reinfecção por cepas recombinantes (ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009), muito comuns no Brasil (FERREIRA *et al.*, 2006).

Tanto nos experimentos de primo infecção com a cepa D8 como nos experimentos de primo infecção com ME49, em animais imunossuprimidos ou não, o desafio com a cepa EGS foi responsável por maiores taxas de mortalidade e de reinfecção em camundongos BALB/c quando comparado com o desafio com a cepa CH3. Conforme discutido anteriormente, as cepas EGS e CH3 são virulentas para camundongos. No entanto, a cepa EGS possui dose letal de 100% ($DL_{100}=1$ taquizoíto), um pouco menor que a dose letal de 100% da cepa CH3 ($DL_{100}>10$ taquizoítos), ou seja, a cepa EGS apresenta maior virulência (HOWE *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2006). Portanto, além das diferenças genotípicas, é possível que a virulência da cepa que é utilizada no desafio seja outro fator que esteja envolvido no processo de reinfecção.

Apesar do aumento significativo nos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* após a reinfecção de camundongos com cepa de genótipo diferente ao da infecção primária já ter sido relatado (DZITKO *et al.*, 2006), a produção de anticorpos IgG e

sua subclasse IgG1 no presente estudo não forneceu evidências consistentes com a ocorrência de reinfecção pelo *T. gondii* tanto em camundongos imunocompetentes primo infectados com a cepa D8 como em camundongos primo infectados com a cepa ME49. O aumento nos níveis desses anticorpos observados no dia 30 em relação ao dia zero ocorreu tanto nos camundongos imunocompetentes primo infectados com D8 e desafiados com as cepas CH3 e EGS como nos camundongos controles infectados somente com a cepa D8. O mesmo foi observado nos níveis de IgG em camundongos infectados somente com a cepa ME49 e nos infectados com essa cepa e desafiados com CH3 e EGS. Já os níveis de IgG1 em camundongos infectados com a cepa ME49 e desafiados com a cepa CH3 aumentaram, enquanto que nos desafiados com a cepa EGS os níveis desse anticorpo diminuiram.

Houve um aumento significativo de IgG2a nos camundongos desafiados com EGS após a primo infecção com D8, o que não foi observado em controles infectados somente com D8, nem em camundongos desafiados com CH3. Essa imunoglobulina está relacionada com uma resposta do perfil Th1, já que sua produção é controlada por IL-12 e IFN- γ (CORREA *et al.*, 2007) e, provavelmente, a reinfecção pela cepa EGS, que foi confirmada através da PCR-RFLP, incitou o aumento de expressão desse perfil de resposta no hospedeiro. Por outro lado, não houve alterações nos níveis de IgG2a nos camundongos infectados com ME49 e desafiados com CH3 e EGS, apesar deles também terem se reinfectado.

Houve um aumento significativo de anticorpos IgM no dia 30 em relação ao dia zero nos camundongos imunocompetentes primo infectados com D8 ou ME49 e desafiados tanto com CH3 como com EGS. Sabe-se que as imunoglobulinas M são as primeiras a serem produzidas em resposta à infecção pelo *T. gondii*, e normalmente são consideradas marcadoras de fase aguda, pois os níveis desse

anticorpo diminuem com o tempo de infecção (GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1996; FILISETTI & CANDOLFI, 2004; CORREA *et al.*, 2007). Portanto, as alterações encontradas nos níveis de IgM no dia 30 sugerem a ocorrência de reinfecção nos grupos desafiados após a infecção primária com D8 ou ME49. Houve também um aumento significativo de anticorpos IgA no dia 30 em camundongos imunocompetentes desafiados com EGS, o que não foi observado nos controles infectados com D8 ou ME49. O aumento também foi observado em camundongos desafiados com CH3 após a infecção primária com ME49. IgA é um importante elemento da imunidade de mucosas contra infecção oral pelo *T. gondii* e é de grande importância para o diagnóstico da toxoplasmose aguda, já que raramente é encontrada na fase crônica (FERREIRA & BORGES, 2002; BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). Portanto, o aumento dessa imunoglobulina também pode estar relacionado à reinfecção pelo *T. gondii*, que foi confirmada nos três grupos em questão. Hassan *et al.* (1999) encontraram um aumento significativo de anticorpos IgM e IgA anti-*T. gondii* em ratos após a reinfecção, mesmo na presença de anticorpos IgG da infecção primária, o que corrobora os resultados encontrados no presente estudo. Além disso, diversos casos com evidências de reinfecção em grávidas cronicamente infectadas que transmitiram o parasito ao feto foram acompanhados pela emergência de anticorpos IgM e/ou IgA maternos (FORTIER *et al.*, 1991; HENNEQUIN *et al.*, 1997; GAVINET *et al.*, 1997; KODJIKIAN *et al.*, 2004; ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009). Contudo, deve-se ter cautela ao empregar o aumento de IgM como marcador de reinfecção com estabelecimento da cepa utilizada no desafio no cérebro dos animais, pois camundongos desafiados com CH3 após a infecção primária com a cepa D8 não se reinfecaram e, ainda assim, apresentaram o aumento dessa imunoglobulina, o que não ocorreu com IgA. Provavelmente, os

parasitos da cepa CH3 conseguiram romper a barreira intestinal e atingir o interior do hospedeiro estimulando a neoformação de anticorpos IgM. Contudo, a resposta imune que se estabeleceu deve ter sido suficiente para controlar a replicação e impedir a invasão do cérebro dos camundongos por essa cepa.

Sabe-se que a Cy tem efeito principalmente sobre as células B (ROLLINGHOFF *et al.*, 1977) e que uma dose única da droga é capaz de inibir a produção de anticorpos em camundongos contra diferentes antígenos (WILLERS & SLUIS, 1975; DOHERTY, 1981). Apesar disso, em camundongos primo infectados com as cepas D8 ou ME49, imunossuprimidos com Cy, e posteriormente desafiados com as cepas CH3 ou EGS, as alterações na produção de anticorpos IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a não forneceram resultados conclusivos, pois essas imunoglobulinas sofreram pouca ou nenhuma interferência com a administração da ciclofosfamida, tendo em vista que não foi observada a diminuição nos níveis de anticorpos no dia 30 em relação ao dia zero, quando ainda não havia iniciado a imunossupressão dos camundongos. Em alguns casos, houve um aumento dessas imunoglobulinas, contrariando os resultados obtidos por Hafizi & Modabber (1978) e Jones *et al.* (1987) que verificaram que a Cy induz uma diminuição nos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em camundongos. Contudo, diferente do presente estudo, os autores administraram a droga em dose única antes da estimulação antigênica e não em um caso de reinfecção em animais com toxoplasmose crônica.

Por outro lado, o efeito da droga imunossupressora parece ter sido mais significativo sobre os anticorpos IgM e IgA, pois tanto os camundongos desafiados com CH3 ou EGS como os camundongos controles infectados somente com D8 ou ME49 apresentaram uma diminuição nos níveis dessas imunoglobulinas no trigésimo dia em relação ao dia 0 (com exceção de IgM para animais primo

infectados com ME49, imunossuprimidos com Cy e desafiados com CH3), enquanto que nos camundongos imunocompetentes foi observado um aumento dessas imunoglobulinas no dia 30. Além disso, a análise dos níveis desses anticorpos realizada com o plasma obtido 30 dias após o desafio com CH3 ou EGS, comparando camundongos imunossuprimidos e não imunossuprimidos, revelou que a produção de IgM e IgA estava significativamente menor nos grupos desafiados que receberam a Cy que nos grupos imunocompetentes desafiados após a primo infecção com as cepas D8 ou ME49. Alguns autores têm mostrado a importância da imunossupressão com Cy sobre a resposta imune humoral e, conseqüentemente, na proteção do hospedeiro contra a infecção pelo *T. gondii*. Hafizi & Modabber (1978) verificaram que a mortalidade de camundongos tratados com Cy e infectados pelo *T. gondii* foi consideravelmente reduzida após a imunização passiva com soro obtido de camundongos cronicamente infectados pela mesma cepa do parasito. A transferência passiva de anticorpos para camundongos BALB/c (genótipo resistente) e C57BL/6 (genótipo suscetível) deficientes em células B inibiu a proliferação do parasito no peritônio desses animais (KANG *et al.*, 2000). A transferência passiva do soro imune prolongou a sobrevivência de camundongos CD4+ “knockout” com resposta intacta para CD8+ e IFN- γ , ou induziu um grau significativo de proteção contra a cepa virulenta RH de *T. gondii* em ratos nu/nu altamente suscetíveis à infecção pelo *T. gondii* (DARCY *et al.*, 1988; JOHNSON & SAYLES, 2002). Além disso, camundongos deficientes em células B exibem uma diminuição da resistência induzida pela vacinação e aumento da carga parasitaria ocular após o desafio (SAYLES *et al.*, 2000). Provavelmente, a menor produção dos anticorpos IgM e IgA encontrada nesse estudo foi um dos fatores determinantes para que as taxas de reinfecção e de mortalidade nos camundongos desafiados fossem maiores nos

animais imunossuprimidos com Cy que nos animais mantidos sem imunossupressão. Conforme discutido anteriormente, as imunoglobulinas M são as primeiras a serem produzidas em resposta à infecção pelo *T. gondii* e, além disso, são fortes ativadoras do sistema do complemento, promovem a inflamação, são capazes de excelente aglutinação e têm um alto nível de citotoxicidade (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004; CORREA *et al.*, 2007). As imunoglobulinas A participam na imunidade de mucosa contra infecção oral por cistos de *T. gondii* sendo portanto importantes para evitar a reinfecção (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Os resultados obtidos neste estudo corroboram a hipótese de que IgA tem grande valor nesse processo e sugere ainda que IgM também seja importante para proteger o hospedeiro contra reinfecção. No entanto, são necessários estudos adicionais para verificar se outros aspectos da resposta imune estão envolvidos no aumento da suscetibilidade à reinfecção nos camundongos BALB/c submetidos à imunossupressão pela Cy.

O leucograma revelou que camundongos cronicamente infectados com as cepas D8 e ME49 posteriormente imunossuprimidos, e camundongos sem infecção imunossuprimidos, apresentaram uma diminuição no número de leucócitos circulantes durante todo o período de administração da Cy, quando comparados com os controles não imunossuprimidos. Esses dados corroboram os resultados encontrados por Tarayre *et al.* (1990) e Pereira (2007) que também encontraram leucopenia em camundongos tratados com essa droga. Além disso, a leucopenia normalmente é utilizada como guia da terapia imunossupressora (ALLISON, 2000). Através da contagem diferencial de leucócitos, ficou evidenciada a diminuição no número de neutrófilos, linfócitos e monócitos nos grupos imunossuprimidos, e essa diferença se mostrou significativa principalmente devido à redução no número de

neutrófilos e linfócitos, em alguns momentos da imunossupressão. A leucopenia encontrada por Pereira (2007) foi devido à diminuição significativa no número de linfócitos, revelada em todas as coletas de sangue realizadas em camundongos BALB/c normais imunossuprimidos com Cy. Contudo, o autor administrou a droga em intervalos de tempo menores que os empregados no presente estudo, o que pode ter contribuído para uma ação mais intensa da droga sobre esse tipo celular, já que a Cy age principalmente sobre linfócitos B, e em dosagens maiores afeta também linfócitos T (SHAND, 1979; TURK & PARKER, 1979). No entanto, seriam necessárias investigações adicionais para afirmar qual população de linfócitos (B ou T) está sendo predominantemente afetada na dosagem utilizada no presente estudo.

Quando ocorre a infecção oral pelo *T. gondii*, os enterócitos respondem secretando quimiocinas e citocinas que atraem leucócitos polimorfonucleares, sendo que os neutrófilos são alguns dos primeiros tipos celulares a chegarem ao intestino. Essas células participam do recrutamento e ativação de outras células imunes, como macrófagos e células dendríticas, importantes na proteção do hospedeiro contra infecção já que desencadeiam uma resposta imune inicial que limita a replicação dos taquizoítos e ajudam na diferenciação do precursor de células Th em células Th1 efetoras, devido ao perfil de citocinas produzidas (PFEFFERKORN *et al.*, 1986; GAZZINELLI *et al.*, 1996; DENKERS & GAZZINELLI, 1998; BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). Linfócitos Th1 CD4+ e os linfócitos T citolíticos CD8+ são os principais envolvidos na resistência à infecção pelo *T. gondii*, pois agem de forma sinérgica, fornecendo uma imunidade protetora que permite a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção crônica (GAZZINELLI *et al.*, 1991). Além disso, anticorpos secretados por células plasmáticas provenientes de linfócitos B também fornecem proteção contra infecção, pois participam da resposta imune inicial, conforme já

discutido, e continuam a ser detectados durante toda a vida do hospedeiro, podendo agir contra o *T. gondii* através da ativação do complemento, promovendo a opsonização e aumentando a capacidade de fagocitose pelos macrófagos (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004; CORREA *et al.*, 2007). Acredita-se que esses fatores imunológicos em conjunto são importantes para proteger o hospedeiro contra reinfecção (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006) e, provavelmente, a diminuição de linfócitos e de neutrófilos evidenciada no leucograma, e a diminuição dos níveis de anticorpos IgM e IgA evidenciada pelo ELISA foram fatores determinantes para o aumento da suscetibilidade do hospedeiro ao desafio e para o aumento das taxas de reinfecção observadas nos camundongos imunossuprimidos.

No presente trabalho foi avaliado pela primeira vez o processo de reinfecção por cepas recombinantes isoladas no Brasil após a infecção primária com uma cepa clonal tipo II, e foi estudada, pela primeira vez, a reinfecção em camundongos imunossuprimidos. Os resultados obtidos corroboram a hipótese de que o processo de reinfecção está relacionado não só com as diferenças genóticas do parasito, mas também com a virulência da cepa e com a integridade imune do hospedeiro. Portanto, é necessário o estabelecimento de prevenção primária, mesmo em pacientes cronicamente infectados pelo *T. gondii*, a fim de se evitar a reinfecção, principalmente em grávidas pelo risco da toxoplasmose congênita, ou em indivíduos submetidos a tratamento imunossupressor com Cy, devido ao aumento da suscetibilidade em um possível evento de reinfecção.

7- CONCLUSÕES

- A infecção primária com uma cepa avirulenta de *T. gondii* é capaz de proteger parcialmente os camundongos contra a mortalidade causada pela cepa virulenta utilizada no desafio, contudo, nem sempre é capaz de evitar a reinfecção e conseqüente colonização do cérebro dos animais pela cepa da infecção secundária.
- Pode ocorrer um aumento no número de cistos cerebrais após o desafio com cepas recombinantes de *T. gondii*, tanto em camundongos imunossuprimidos como em camundongos não imunossuprimidos, contudo, esse critério não é um bom marcador de reinfecção.
- A PCR-RFLP se mostrou um método mais sensível que o bioensaio para detectar a ocorrência de reinfecção nos camundongos.
- A ciclofosfamida, na dosagem empregada, não possui efeitos tóxicos que possam levar camundongos não infectados à morte. Além disso, a droga não é capaz de reativar a infecção crônica recente por cepa avirulenta de *T. gondii*.
- A imunossupressão com ciclofosfamida torna camundongos BALB/c susceptíveis ao desafio com outra cepa de *T. gondii*, o que está evidenciado pelo aumento das taxas de mortalidade e de reinfecção quando comparados com animais não imunossuprimidos.

- A diferença genotípica entre as cepas de *T. gondii* é um fator determinante na ocorrência de reinfecção, sendo que, quanto maior a diferença entre a cepa da infecção primária e a cepa do desafio, menor é a proteção conferida contra a reinfecção.
- A virulência da cepa de *T. gondii* que é utilizada no desafio é outro fator que está envolvido no processo de reinfecção.
- A ocorrência de reinfecção pelo *T. gondii* em camundongos BALB/c imunocompetentes está relacionada a um aumento nos níveis de IgA plasmático, que pode ser inclusive utilizado como indicativo de reinfecção.
- O desafio de camundongos imunocompetentes com cepas recombinantes de *T. gondii* também está correlacionado ao aumento nos níveis de IgM plasmático. Contudo, esse critério não pode ser usado para determinar o sucesso da reinfecção com o estabelecimento da cepa da infecção secundária no cérebro dos animais.
- O aumento da suscetibilidade à reinfecção em camundongos imunossuprimidos está relacionado à diminuição dos níveis de anticorpos IgM e IgA anti-*T.gondii*, em decorrência do uso da ciclofosfamida.
- A leucopenia promovida pela ciclofosfamida em camundongos com infecção crônica recente por cepa avirulenta de *T. gondii* provavelmente está relacionada ao aumento da suscetibilidade à reinfecção.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology.*, v. 47, p. 63-83, 2000.

ARAÚJO, F. G. Depletion of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect. Immun.*, v. 59, n. 5, p. 1614-1619, 1991.

ARAÚJO, F.; SLIFER, T.; KIM, S. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *J. Parasitol.*, v. 83, n. 3, p. 521-522, 1997.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.*, v.195, n.12, p. 1625–1633, 2002.

BELFORT-NETO, R.; NUSSENBLATT, V.; RIZZO, L.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; NUSSENBLATT, R.; KHAN, A.; SIBLEY, L. D.; BELFORT-Jr., R. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 79, n.1, p. 111-114, 2007.

BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A.; SODRÉ, F. C.; PINTO, G. M. T.; AMENDOEIRA, M. R. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 50, p. 17-20, 2008.

BOOTHROYD, J. C. & GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection do different strains cause different disease? *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 5, p. 438 – 442, 2002.

BRANDÃO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N. & VITOR, R. W. A. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. *Parasite*, v.13, p. 143 – 149, 2006.

BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N.; GAZZINELLI, R. T.; CAETANO, B. C.; FERREIRA, A. M.; SILVA, L. A.; VITOR, R. W. A. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN- γ and IL-10. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 2, p. 241-245, 2009.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. C.; KASPER, L.H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell. Microbiol.*, v. 8, n. 4, p. 535-544, 2006.

BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends in Parasitol.*, v. 22, n. 10, p. 448-452, 2006.

CAVALCANTE, G. T.; AGUILAR, D. M.; CAMARGO, L. M.; LABRUNA, M. B.; de ABDRADE, H. F.; MEIRELES, L. R.; DUDEY, J. P.; THULLIEZ, P.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. *J. Parasitol.*, v. 92, n. 3, p. 647-649, 2006.

CHARDÉS, T. & BOUT, D. Mucosal immune response in toxoplasmosis, *Res. Immunol.*, v. 144, p. 57-60, 1993.

COELHO, R. A. L.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO Jr., L. B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 45, n.4, p. 229-231, 2003.

CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.*, v. 29, p. 651-660, 2007.

COUTINHO, S. G.; LEITE, M. A.; AMENDOEIRA M. R.; MARZOCHI M. C. Concomitant cases of acquired toxoplasmosis in children of a single family: evidence of reinfection. *J. Infect. Dis.*, v.146, n. 1, p. 30-33, 1982.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.*, v. 178, p. 1041-1048, 1993.

DAO, A.; FORTIER, B.; SOETE, M.; PLENAT, F.; DUBREMETZ, J.-F. Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype. *Int. J. Parasitol.*, v. 31, p. 63-65, 2001.

DARCY, F.; DESLEE, D.; SANTORO, F.; CHARIF, H.; AURIAULT, C.; DECOSTER, A.; DUQUESNE, V.; CAPRON, A. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.*, v.10, p. 553-567, 1988.

DARDÉ, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super Sanità*, v. 40, n. 1, p. 57-63, 2004.

DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B. & PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.*, 78: 786 – 794, 1992.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; CAMPOS, M.A.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; BIEKER, U.; RESENDE, M.G.; MANSUR, D.S.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R.R.; GOLENBOCK, D.T.; GAZZINELLI, R.T.; SCHWARZ, R.T. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, v. 179, n. 2, p. 1129–1137, 2007.

DEFRANCE, T.; VANBERVLIET, B.; BRIÈRE, F.; DURAND, I.; ROUSSET, F.; BANCHEREAU, J. Interleukin 10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naïve human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.*, v. 175, p. 671-682, 1992.

DENKERS, E.Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 39, n.3, p.193-203, 2003.

DENKERS, E.Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2010, p. 1-7, 2010.

DENKERS, E.Y. & GAZZINELLI, R.T. Regulation and function of T cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 11, p. 569-588, 1998.

DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, M. V.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná state, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 47, n. 4, p. 185-189, 2005.

DOHERTY, N. S. Selective effects of immunosuppressive agents against the delayed hypersensitivity response and humoral response to sheep red blood cells in mice. *Agents Actions*, v. 11, n. 3, p. 237-242, 1981.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in cats. *Feline Pract.*, v. 16, n. 4, p. 12-26, 1986.

DUBEY, J. P. & BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, Florida. CRC Press, 1988.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E. & THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p. 99 – 105, 2002.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. & SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 11, p. 267 – 299, 1998.

DUBEY, J. P. ; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H. ; DAHL, E. ; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L. B.; SREEKUMAR, C. ; VIANNA, M. C. & LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 117, p. 229 – 234, 2003b.

DUBEY, J. P. ; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR C.; ; DAHL, E. ; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H H.; VIANNA, M. C.; KWOK, O C.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.& LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterizatoin of isolates. *J. Parasitol.*, v. 90, p. 721 – 726, 2004.

DUBEY, J. P.; SILVA, D. S.; LEHMANN, T. & BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *Toxoplasma gondi* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. *J. Parasitol.*, v. 98 (4), p. 851 – 853, 2003a.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS N. A. R.; RUAS, J. L.; SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para´ state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.*, v. 143, p. 182-188, 2007.

DZITKO, K.; STACZEK, P.; GATKOWSKA, J.; DLUGONSKA, H. *Toxoplasma gondii*: Serological recognition of reinfection. *Exp. Parasitol.*, v. 112, p. 134-137, 2006.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. *J. Infect. Dis.*, v. 199, p. 280-285, 2009.

ELSAID, M.M.; MARTINS, M.S.; FRÉZARD, F.; BRAGA, E.M.; VITOR, R.W.A. Vertical toxoplasmosis in a murine model. Protection after immunization with antigens

of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 99-104, 2001.

EMADI, A.; JONES, R J.; BRODSKY, R.A Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, v. 6, n. 11, p. 638-647,2009.

FAZAELI, A.; CARTER, P. E.; DARDÉ, M. L. & PENNINGTON, T. H. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* by GRA6 gene sequence analysis. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 637- 642, 2000.

FERREIRA, A. M.; MARTINS, M. S.; VITOR, R. W. A. Virulence for BALB/ c mice antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. *Parasite*, v. 8, p. 99-105, 2001.

FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W. A., GAZZINELLI, R. T. & MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.*, v.6, p. 22 – 31,2006.

FERREIRA, M. S. & BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 4, p. 443-457, 2002.

FILISETTI, D. & CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super Sanita*, v. 40, p. 71-80, 2004.

FIORENTINO, B. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse t helper cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, v. 170, p. 2081-2095, 1989.

FORTIER, B.; AYSSI, E.; AJANA, F.; DIEUSART, P.; DENIS, P. ; MARTIN DE LASSALLE, E. ; LECOMTE-HOUCKE, M. ; VINATIER, D. Spontaneous abortion and reinfection by *Toxoplasma gondii*. *Lancet*, v. 338, p. 444, 1991.

FRENKEL, J.K. Effects of cortisone, total body irradiation and nitrogen mustard on chronic latent toxoplasmosis. *Am. J. Pathol.*, v. 33, p. 618-619, 1957.

FRENKEL, J.K.; TAYLOR, D.W. Toxoplasmosis in immunoglobulin M suppressed mice. *Infect. Immun.*, v. 38, p. 360-367, 1982.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MÉNDEZ, J.; CORREA, O.; MORGADES, D.; RODRÍGUEZ, A. An investigation of sterile immunity against toxoplasmosis in rats. *Exp. Parasitol.*, v. 107, p. 14-19, 2004.

FURUTA, T.; KIKUCHI, T.; AKIRA, S.; WATANABLE, N.; YOSHIKAWA, Y. Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. *Int. Immunol.*, v. 18, n. 12, p.1655–1662, 2006.

FUX, B.; RODRIGUES, C. V.; PORTELA, R. W.; SILVA, N. M.; SU, C.; SIBLEY, S.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. T. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, v.71, p. 6392-6401, 2003.

GARCIA, M.; SERTÓRIO, S. P.; ALVES, G. J.; CHATE, S. C.; CARNEIRO, S.; LALLO, M. A. Ovine experimental immunosuppression using cyclophosphamide. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 24, n. 3, p. 115-119, 2004.

GAVINET M. F., ROBERT F., FIRTION G., DELOUVRIER E., HENNEQUIN C., MAURIN J. R., TOURTE-SCHAEFER C.; DUPOUY-CAMET J. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 1276-1267, 1997.

GAZZINELLI, R. T.; AMICHAY, D.; SCHARTON,-KERSTEN, T.; GRUNVALD, E.; FARBER, J. M.; SHER, A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 219, p. 127-140, 1996.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role CD4⁺ and CD8⁺ t lymphocytes in INF-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.*, v. 146, p. 286-292, 1991.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A .; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by na intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

GAZZINELLI, R.; YUHUI, X.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, v. 149, p. 175-180, 1992.

GELLIN, B.G. & SOAVE, R. Coccidian infection in AIDS – Toxoplasmosis, cryptosporidiosis, and isosporiasis. *Med. Clinics North Am.*, v. 76, p. 205-234, 1992.

GORGIEVSKI-HRISOHO, M.; GERMANN, D.; MATTER, L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, n. 6, p. 1506-1511, 1996.

GOYAL, M.; GANGULY, N.K.; MAHAJAN, R. C. Immunological response in experimentally reactivated toxoplasmosis in mice. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 178, p. 269-278, 1989.

HAFIZI, A.; MODABBER, F. Z. Effect of cyclophosphamide on *Toxoplasma gondii* infection: reversal of the effect by passive immunization. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 33, p. 389-394, 1978.

HASSAN, M.; HEGAB, M.; ABAZA, B.E.; NASR, M.E.; MOWAFY, N.M. Specific anti-*Toxoplasma* antibodies in relation to infection and reinfection using different infective stages. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* V.29, n.1, p. 119-129, 1999.

HENNEQUIN, C., DUREAU P., N'GUYEN L., THULLIEZ P., GAGELIN B.; DUFIER J. L. Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 16, p. 75-77, 1997.

HERMANS, I. F.; CHONG, T. W.; PALMOWSKI, M. J.; HARRIS, A. L.; CERUNDOLO, V. Synergistic Effect of Metronomic Dosing of Cyclophosphamide Combined with Specific Antitumor Immunotherapy in a Murine Melanoma Model. *Cancer Res.*, v. 63, p. 8408-8413, 2003.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 8, p.634-640, 2002.

HOFFLIN, J. M.; FRANCES, C. K.; REMINGTON, J. S. Murine Model of Intracerebral Toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, v. 155, n. 3, p. 550 – 557, 1987.

HOWARD, M.; O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol. Today*, v.13, p. 198–200, 1992.

HOWE, D.K. & SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.*, v. 172, p. 1561 – 1566, 1995.

HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C. & SIBLEY, L. D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 5193 – 5198, 1996.

ISRAELSKI, D.M.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v.2. n. 2, p. 429-445, 1988.

JACOBSON, N. G.; SZABO, S. J.; WEBER-NORDT, R. M.; ZHONG, Z.; SCHREIBER, R. D.; DARNELL, J.E.; MURPHY, K. M. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription Stat3 and Stat4. *J. Exp. Med.*, v. 181, p. 1755-1762, 1995.

JOHNSON, L.L. & SAYLES, P.C. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 185–191, 2002.

JONES, T. C.; ALKAN, S.; ERB, P. Murine spleen and lymph node cellular composition and function during cyclophosphamide and splenectomy induced resistance to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.*, v. 9, p. 117-131, 1987.

KANG, H.; REMINGTON, J.S.; SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN- γ , TNF- α , and inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.*, v. 164, p. 2629–2634, 2000.

KASPER, L.; COURRET, N.; DARCHE, S.; LUANGSAY, S.; MENNECHET, F.; MINNS, L.; RACHINEL, N.; RONET, C.; BUZONI-GATEL, D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int. J. Parasitol.*, v. 34, p. 401-409, 2004.

KHALIFA, A. M.; IBRAHIM, I. R.; EL-KERDANY. Coccidial infection in immunosuppressed mice: prophylaxis and treatment with dehydroepiandrosterone. *East. Mediterr. Health J.*, v. 6, n. 5-6, p. 908-918, 2000.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT Jr., R.; VITOR, R. W. A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KODJIKIAN, L.; HOIGNE, I; ADAM, O.; JACQUIER, P.; AEBI-OCHSNER, C.; AEBI, C.; GARWEG, J.G. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 23, p. 272-274, 2004.

LANG, C.; GROB, U.; LÜDER, G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.*, v. 100, p. 191-203, 2007.

LEBAS, F.; DUCROCQ, S.; MUCIGNAT, V.; PARIS, L.; MÉGIER, P. ; BAUDON, J. J. ; GOLD, F. Congenital toxoplasmosis : infection during pregnancy in an immune and immunocompetent woman. *Arch. Pediatr.*, v. 11, p. 926-928, 2004.

LEHMANN, T.; BLACKSTON, C. R.; PARMLEY, S. F.; REMINGTON, S. F. & DUBEY, J. P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J. Parasitol.*, v. 86, p. 960 – 971, 2000.

LETTERIO, J.J.; ROBERTS, A.B. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.*, v.16, p.137–161, 1998.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J. & WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, v. 27, p. 37 – 58, 1980.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* V. 193, p. 265-275, 1951.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis encephalitis. *J. Infect. Dis.*, v. 157. p. 1-6, 1988.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, v. 15, n. 2, p. 211-222, 1992.

LUNDE, M. N.; JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* v. 69, p. 806-808, 1983.

MA, X.; CHOW, J.C.; GRI, G.; CARRA, G.; GEROSA, F.; WOLF, S. F.; DZIALO, R.; TRINCHIERI, G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by Interferon γ in monocytic cells. *J. Exp. Med.*, v. 183, p. 147-157, 1996.

MATAR, P.; ROZADOS, V.R.; GERVASONI, S.I.; SCHAROVSKY, O.G. Down regulation of T-cell-derived IL-10 production by low-dose cyclophosphamide treatment in tumor-bearing rats restores in vitro normal lymphoproliferative response. *Int. Immunopharmacol.*, v. 1, n.2, p. 307-319, 2001.

MILLAR, P. R.; DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; CARLI, A. L.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. Plasmaprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro de suínos e em indivíduos com outras atividades na cidade de Palma, Paraná, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 37, n. 1, p. 292-295, 2007.

MORDUE, D. G.; MONROY, F.; REGINA, M. L.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.*, v. 167, p. 4574-4584, 2001.

MUN, H.S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; CHEN, M.; PIAO, L.X.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; ISHIKURA, H.; YANO, A. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int. Immunol.*, v. 15, n. 9, p. 1081–1087, 2003.

NEYER, L. E.; GRÜNIG, G.; FORT, M.; REMINGTON, J. S.; RENNICK, D.; HUNTER, C. A. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, v. 65, n. 5, p. 1675-1682, 1997.

NICOLLE, C. ; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisme voisins) du gondi. *C. R. Acad. Sci.*, v. 147, p. 763-766, 1908.

ODAERT, H.; SOËTE, M.; FORTIER, B.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. Stage conversion of *Toxoplasma gondii* in mouse brain during infection and immunodepression. *Parasitol. Res.*, v. 82, p. 28-31, 1996.

PEREIRA, A. Efeitos imunossupressores da dexametasona, ciclosporina e ciclofosfamida sobre linfócitos T e B de camundongos BALB/c. 2007, 54 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Paulista, São Paulo.

PFEFFERKORN, E.R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. *J. Interferon Res.*, v. 6, p. 267-279, 1986.

PINON, J. M. ; FOU DRINIER, F. ; MOUGEOT, G. ; NIEL, G. ; MARX, C. ; BARNIN, A. ; TIRARD, V. ; BESSIÈRES, M. ; DANIS, M. ; CAMERLINCK, P. ; SEGUELA, J. ; REMY, G. ; FROTTIER, J. Pic-Eslisa et isotypes spécifiques IgA ou EgE dans l'évaluation des risques toxoplasmiques chez les sujets immunodéprimés. *Rev. Fr. Lab.*, v. 223, p. 103-107, 1991.

REMINGTON, J.S. & DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington J.S.; KLEIN, J.O. editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 3rd ed. Philadelphia: *WB Saunders*, p. 89 – 195, 1990.

ROLLINGHOFF, M.; STARZINSKI-POWITZ, A.; PFIZENMAIER, K.; WAGNER, H. Cyclophosphamide-sensitive T-lymphocytes suppress the in vivo generation of antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* v. 145, p. 455–459, 1977.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2 Ed., Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Lab, 1989.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a T-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, v. 90, p. 655-656, 1993.

SANTOS, G.; OWENS, A. H. Jr.; SENSENBRENNER, L.L. Effect of selected agents on antibody production in man: a preliminary report. *Am. N.Y. Acad. Sci.*, v. 114, p. 404-423, 1964.

SAYLES, P.C.; GIBSON, G.W.; JOHNSON, L.L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 1026-1033, 2000.

SCANGA, C.A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E.Y. MEDZHITO, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.*, v. 168, n. 12, p. 5997-6001, 2002.

SHAND, F. L. The immunopharmacology of cyclophosphamide. *Int. J. Immunopharmac.*, v. 1, p. 165-171, 1979.

SILVEIRA C., FERREIRA R., MUCCIOLI C., NUSSENBLATT R.; BELFORT R. JR. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 136, n. 2, p. 370-371, 2003.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattiache ricorda in moltopunti il kalaazar dell'uomo. Nota preliminaire pel. *Rev. Soc. Sci. São Paulo*, v. 3, p. 109-112, 1908.

STENDER, H.S.; RINGLEB, D.; STRAUCH, D.; WINTER, H. Die Beinflussung der Antikoörperbildung durch Zytostatika and Rontgenbestrahlung. *Strahlentherapie* v. 43, p. 392-399, 1959.

SU, C.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* V. 99, p. 10753-10758, 2002.

SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8⁺ cytotoxic T Lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J. Immunol.*, v.147, p. 3955-3959, 1991.

SUMYUEN, M. H.; GARIN, Y. J. F.; DEROUIN, F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol. Res.*, v. 82, p. 681-686, 1996.

TARAYRE, J. P.; BARBARA, M.; ALIAGA, M.; TISNE-VERSAILLES, J. Comparative actions of immunosuppressants, glucocorticoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs on various models of delayed hypersensitivity and on a non-immune inflammation in mice. *Arzneimittel-forschung*, v.40, n. 10, p. 1125-31,1990.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R. & WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to human. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1217 – 1258, 2000.

TURK, J. L. & PARKER, D. The effect of cyclophosphamide on the immune response. *J. Immunopharmacol.*, v. 1, n. 2, p. 127-37,1979.

WECHSLER, B; DU, L.T.H.; VIGNES, B.; PIETTE, J.C.; CHOMETTE, G. ; GODEAU, P. Toxoplasmose et lupus revue de la littérature à propos de 4 observations. *Ann Méd Interne*. v. 137, p. 324-330, 1986.

WILLE, U.; VILLEGAS, E. N. ; STRIEPEN, B. ; ROOS, D. S. ; HUNTER, C.A. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasite. Immunol.* v.23, p. 291-296, 2001.

WILLERS, J. M. N.; SLUIS, S. The influence of cyclophosphamide on antibody formation in the mouse. *Ann. Immunol.* v. 126, p. 267-279, 1975.

YANG, H.; ZHANG, A.; YANG, Y.; QIAN, Z. Study on invasibility and multiplication of *Toxoplasma* strains with different virulence toward Vero-cells. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. V. 16, n.3, p. 185-188, 1998.

YAP, G. S.; SHAW, M. H.; LING, Y.; SHER, A. Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect.*, v. 8, p. 1117-1118, 2006.

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J.F.; BANNENBERG, G.L.; SERHAN, C.N.; HAYDEN, M.S.; HIENY, S.; SUTTERWALA, F.S.; FLAVELL, R.A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1626–1629, 2005.