

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Geane Peroni Brandão

**Avaliação da reinfecção de camundongos
BALB/c e C57BL/6 com cepas de
Toxoplasma gondii isoladas no Brasil**

**Belo Horizonte
Minas Gerais, Brasil
2008**

Geane Peroni Brandão

**Avaliação da reinfecção de camundongos
BALB/c e C57BL/6 com cepas de
Toxoplasma gondii isoladas no Brasil**

Tese de Doutorado desenvolvida nos Laboratórios de Toxoplasmose e Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Prof. Ricardo Wagner A. Vitor
Universidade Federal de Minas Gerais

Colaboradores: Prof^a Maria Norma Melo
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a Cláudia Martins Carneiro
Universidade Federal de Ouro Preto

**Belo Horizonte, MG
2008**

*Aos meus pais Geraldo e Ana Lúdia
Vocês foram os primeiros a sonhar...*

*Ao meu marido Jair Ricardo, presente de Deus,
Que acreditou no sonho e sonhou comigo.*

Agradecimentos

A Deus pelo seu infinito amor...

Amor este que me permitiu nascer não somente duas, mas três vezes. Obrigada, Senhor!

Aos meus irmãos Gean Luiz e Gesiane, na verdade mais que irmãos: amigos!

Ao Prof. Ricardo Vitor, mestre e amigo. Obrigada pela paciência e compreensão especialmente no último ano;

À Prof^a Maria Norma, carinhosa, humilde e sábia. Grandes ensinamentos!

À Prof^a Cláudia pela grande contribuição e por estar sempre disposta a ajudar;

Ao Programa de Pós Graduação, na pessoa do seu coordenador, Prof. Pedro Marcos Linardi
A confiança depositada permitiu crescimento e frutos;

Ao Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, na pessoa do seu chefe, Prof^a Maria Aparecida Gomes, pelas oportunidades e facilidades para o desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Daniella D'Ávilla , são com poucos que podemos contar. Obrigada!

Ao amigo Marco que mesmo longe está sempre presente;

À amiga Rosálida, seu dom é especial: servir com amor! Obrigada por tudo que você faz;

À Soraia e Rosângela pelas palavras que direcionam nos momentos em que a solução parece distante;

À Bráulia Caetano, sua contribuição foi inestimável;

À Adriana Ferreira pelas dicas preciosas durante a realização dos primeiros passos deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Toxoplasmose: Ana Carolina, Letícia, Júlia, Anderson e Danúbia. Aprendi e cresci muito com todos vocês. Obrigada!

“Os sonhos trazem saúde para a emoção, equipam o frágil para ser autor da sua história, renovam as forças do ansioso, animam os deprimidos, transformam os inseguros em seres humanos de valor.

Os sonhos fazem os tímidos terem golpes de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades.”

Augusto Cury

RESUMO

No presente trabalho foi estudado a reinfecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 pelo *Toxoplasma gondii*. Para determinar se o genótipo das cepas pode modificar o padrão de proteção, a primo infecção e o desafio foram realizados utilizando diferentes cepas recombinantes tipo I-III de *T. gondii*. Os camundongos foram primo infectados com a cepa D8, não virulenta, e desafiados após 45 ou 180 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N, recombinantes tipo I-III. Após trinta dias do desafio, os cistos cerebrais obtidos dos camundongos sobreviventes foram inoculados em camundongos BALB/c ou C57BL/6 para a realização do bioensaio e em camundongos “swiss” para induzir uma infecção aguda e replicação dos taquizoítos que foram obtidos pela lavagem do peritônio. As amostras de DNA purificadas dos taquizoítos foram submetidas à PCR-RFLP utilizando os marcadores *cS10-A6* e *L363* para distinguir diferentes cepas de *T. gondii* em possíveis coinfeções. A resposta imune anti-*T. gondii* foi avaliada por meio da dosagem de IFN- γ e IL-10 em sobrenadantes de culturas de esplenócitos obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, 45 e 180 dias após a primo infecção e estimulados “in vitro” com antígeno de *T. gondii*. No plasma destes animais foram dosados os níveis de IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA. A PCR-RFLP demonstrou que 45 dias após a primo infecção com a cepa D8 a reinfecção ocorreu em camundongos BALB/c desafiados com as cepas EGS e N ou EGS, CH3 e N aos 180 dias da primo infecção. Os camundongos C57BL/6 se reinfectaram com as cepas EGS, CH3 e N aos 45 e 180 dias após a primo infecção. Em camundongos BALB/c foram detectados altos níveis de IFN- γ após a infecção com D8, sem diferença significativa entre 45 e 180 dias. Entretanto, foram observados níveis significativamente maiores de IL-10 na cultura de esplenócitos e de IgG1 e IgA plasmáticos quando foram testadas as amostras obtidas aos 180 dias de infecção. Os níveis de IFN- γ após infecção com D8 foram mais baixos em camundongos C57BL/6 que em camundongos BALB/c. Em camundongos C57BL/6 foram observados níveis plasmáticos maiores de IgG1 e IgG2a quando testadas as amostras obtidas aos 180 dias da primo infecção em comparação às amostras obtidas aos 45 dias. Em conclusão, camundongos BALB/c e C57BL/6 são susceptíveis a reinfecção com diferentes cepas de *T. gondii* e a susceptibilidade de camundongos BALB/c se correlaciona com o aumento da produção de IL-10. Foi demonstrado que a reinfecção pelo *T. gondii* depende da linhagem de camundongo, do tempo de infecção e do genótipo da cepa utilizada no desafio.

ABSTRACT

In the present work we studied *Toxoplasma gondii* reinfection in BALB/c and C57BL/6 mice. In order to determine whether genotype of the strains may modify the pattern of protection, prime infection and challenge was performed with different recombinant type I-III *T. gondii* strains. Mice were prime infected with the non-virulent D8 strain and challenged, 45 or 180 days after, with recombinant type I-III strains EGS, CH3 or N. Thirty days after the challenge, brain cysts were obtained from survivor mice and bioassayed in BALB/c or C57BL/6 mice and inoculated in Swiss mice in order to induce an acute infection and replication of tachyzoites that were recovered by peritoneal washing. DNA samples purified from tachyzoites were submitted to PCR-RFLP analysis at *cS10-A6* and *L363* loci in order to distinguish the different *T. gondii* strains present in possible coinfections. Anti-toxoplasma immune responses were evaluated in D8-primed BALB/c and C57BL/6 mice at 45 and 180 days post infection by detection of IFN- γ and IL-10 producing T cells in splenocytes samples stimulated “in vitro” with *T. gondii* antigen and measurement of total IgG, IgG1, IgG2a, IgM and IgA levels in blood plasma samples. PCR-RFLP assays demonstrated that, after a prime infection with D8 strain, BALB/c mice are reinfected with EGS and N strains at 45 days post prime infection, or EGS, CH3 and N strains at 180 days post prime-infection. C57BL/6 mice are reinfected with EGS, CH3 and N strains at 45 and 180 days post prime infection. We detected high levels of IFN- γ after D8 infection, with no significant difference between 45 and 180 days interval in BALB/c mice. However, we observed higher levels of IL-10 in splenocyte cultures and higher plasmatic IgG1 and IgA when testing samples obtained 180 days after infection. Levels of IFN- γ after D8 infection were lower in C57BL/6 mice than in BALB/c mice. In C57BL/6 mice we observed higher plasmatic IgG1 and IgG2a when testing samples obtained 180 after prime infection in comparison to samples obtained 45 days after infection. In conclusion, BALB/c and C57BL/6 mice are susceptible to reinfection with different strains of *T. gondii* and BALB/c mice susceptibility to reinfection correlates with enhance of IL-10 production. It was demonstrated that reinfection depend on the mice lineage, time of infection and genotype of strain used in challenge.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Delineamento experimental da infecção e do desafio de camundongos BALB/c e C57BL/6 com as diferentes cepas de *T. gondii*.....23
- Figura 2 - PCR-RFLP em dois loci de *T. gondii*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfecção em DNA extraído de “pool” de cérebros de camundongos BALB/c 45 dias após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA. A: PCR-RFLP do loco *cS10-A6* com a endonuclease de restrição *RsaI*. B: PCR-RFLP do loco *L363* com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*.....42
- Figura 3 - PCR-RFLP em dois loci de *T. gondii*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfecção em DNA extraído de “pool” de cérebros de camundongos BALB/c 180 dias após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA. A: PCR-RFLP do loco *cS10-A6* com a endonuclease de restrição *RsaI*. B: PCR-RFLP do loco *L363* com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*.....43
- Figura 4 - 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, para verificação da reinfecção em DNA extraído individualmente de cérebros de camundongos BALB/c 45 (A) e 180 dias (B) após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb).....44
- Figura 5 - “Western blotting” representativo em plasma de camundongos BALB/c coletado 180 dias após a primo infecção com a cepa D8, nos dias 0 e 30 após o desafio com as cepas EGS (A), CH3 (B) e N (C). Taquizoítos da cepa RH (10^6) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % e transferidos para membrana de nitrocelulose. kDa = Marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda da figura. C = controle negativo da reação.....53
- Figura 6 - Corte histológico mostrando infiltrado inflamatório perivascular no cérebro de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 (D) e desafiados aos 45 dias da primo infecção com as cepas EGS (A), CH3 (B) e N (C) do *T. gondii*. Hematoxilina Eosina.....59
- Figura 7 - Corte histológico mostrando necrose no cérebro de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 (B) e desafiados aos 180 dias da primo infecção com a cepa EGS (A) do *T. gondii*. Hematoxilina Eosina.....60
- Figura 8 - PCR-RFLP em dois loci de *T. gondii*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfecção em DNA extraído de “pool” de cérebros de camundongos C57BL/6 45 dias após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA. A: PCR-RFLP do loco *cS10-A6* com a
-

endonuclease de restrição *RsaI*. B: PCR-RFLP do loco *L363* com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*.....70

Figura 9 - PCR-RFLP em dois loci de *T. gondii*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfeção em DNA extraído de “pool” de cérebros de camundongos C57BL/6 180 dias após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA. A: PCR-RFLP do loco *cS10-A6* com a endonuclease de restrição *RsaI*. B: PCR-RFLP do loco *L363* com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*.....71

Figura 10 - 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, para verificação da reinfeção em DNA extraído individualmente de cérebros de camundongos C57BL/6 45 (A) e 180 dias (B) após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA.....72

Figura 11 - “Western blotting” em plasma de camundongos C57BL/6 coletado 45 dias após a primo infecção com a cepa D8, nos dias 0 e 30 após o desafio com as cepas EGS (A) e CH3 (B). Taquizoítos da cepa RH (10^6) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % e transferidos para membrana de nitrocelulose. kDa = Marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda da figura. C = controle negativo da reação. As setas indicam proteínas que passaram a ser reconhecidas no dia 30.....81

Figura 12 - “Western blotting” em plasma de camundongos C57BL/6 coletado 180 dias após a primo infecção com a cepa D8, nos dias 0 e 30 após o desafio com as cepas EGS (A) e CH3 (B). Taquizoítos da cepa RH (10^6) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % e transferidos para membrana de nitrocelulose. kDa = Marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda da figura. C = controle negativo da reação. As setas indicam proteínas que passaram a ser reconhecidas no dia 30.....82

Figura 13 - Corte histológico mostrando infiltrado inflamatório perivascular no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 (C) e desafiados aos 45 dias da primo infecção com as cepas EGS (A) e CH3 (B) do *T. gondii*: não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos. Hematoxilina eosina.....87

Figura 14 - Corte histológico mostrando infiltrado inflamatório perivascular no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 (B) e desafiados aos 180 dias da primo infecção com a cepa CH3 (A) do *T. gondii*: não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos. Hematoxilina eosina.....88

Gráfico 1 - Sobrevivência de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N após 45 dias de infecção. Controles primo infectados com as cepas D8, EGS, CH3 e N.....35

Gráfico 2 - Sobrevivência de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N após 180 dias de infecção. Controles primo infectados com as cepas D8, EGS, CH3 e N.....35

Gráfico 3 - Número médio de cistos no cérebro de camundongos BALB/c primo infectados com D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N. Grupos experimentais: animais primo infectados com a cepa D8 (grupo D) e animais primo infectados com D8 e desafiados aos 45 dias com as cepas EGS (grupo A), CH3 (grupo B) e N (grupo C).....	36
Gráfico 4 - Número médio de cistos no cérebro de camundongos BALB/c primo infectados com D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N. Grupos experimentais: animais primo infectados com a cepa D8 (grupo K) e animais primo infectados com D8 e desafiados aos 180 dias com as cepas EGS (grupo H), CH3 (grupo I) e N (grupo J). * p< 0.05.....	36
Gráfico 5 - Anticorpos específicos anti- <i>T. gondii</i> 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 EGS, CH3 e N. A - IgG total, B - IgG1 e C - IgG2a. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio. * - p<0,05.....	47
Gráfico 6 - Anticorpos específicos anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasmas de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepas EGS, CH3 e N. A - IgM e B - IgA. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio. * - p<0,05.....	48
Gráfico 7 - Anticorpos específicos anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N. A - IgG total, B - IgG1 e C - IgG2a. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.....	49
Gráfico 8 - Anticorpos específicos anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N. A - IgM e B - IgA. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio. * p<0,05.....	50
Gráfico 9 - Anticorpos específicos IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c com 45 e 180 dias de infecção com a cepa D8. * p<0,05.....	51
Gráfico 10 - Níveis de INF- γ em camundongos BALB/c infectados por via oral com 20 cistos da cepa D8 de <i>T. gondii</i> aos 45 dias após a infecção (BALB 45 d.a.i.), 180 dias após a infecção (BALB 180 d.a.i.) e não infectado (NI). Os valores mostram a média de oito animais.....	55
Gráfico 11 - Níveis de IL-10 em camundongos BALB/c infectados por via oral com 20 cistos da cepa D8 de <i>T. gondii</i> aos 45 dias após a infecção (BALB 45 d.a.i.), 180 dias após a infecção (BALB 180 d.a.i.) e não infectado (NI). Os valores mostram a média de oito animais. *p<0,05.....	55
Gráfico 12 - Sobrevivência de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N após 45 dias de infecção. Controles primo infectados com as cepas D8, EGS, CH3 e N.....	63

Gráfico 13 - Sobrevivência dos camundongos C57BL/6 infectados com 20 cistos da cepa D8 do <i>T. gondii</i> e acompanhados por 180 dias.....	63
Gráfico 14 – Sobrevivência de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N após 180 dias de infecção. Controles primo infectados com as cepas D8, EGS, CH3 e N.....	64
Gráfico 15 - Número médio de cistos no cérebro de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS e CH3. Grupos experimentais: animais primo infectados com a cepa D8 (grupo R) e animais primo infectados com D8 e desafiados aos 45 dias com as cepas EGS (grupo O), CH3 (grupo P).....	65
Gráfico 16 - Número médio de cistos no cérebro de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS e CH3. Grupos experimentais: animais primo infectados com a cepa D8 (grupo Z) e animais primo infectados com D8 e desafiados aos 180 dias com as cepas EGS (grupo V), CH3 (grupo X).....	65
Gráfico 17 - Anticorpos específicos anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepa EGS e CH3. A - IgG total, B - IgG1 e C - IgG2a. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.....	75
Gráfico 18 - Anticorpos específicos anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepas EGS e CH3. A - IgM e B - IgA. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio. * - $p < 0,05$	76
Gráfico 19 - Anticorpos específicos anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 180 dias com as cepa EGS e CH3. A - IgG total, B - IgG1 e C - IgG2a. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.....	77
Gráfico 20 - Anticorpos específicos anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 180 dias com as cepa EGS e CH3. A - IgM e B - IgA. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.....	78
Gráfico 21 - Anticorpos específicos IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 com 45 e 180 dias de infecção com a cepa D8. * $p < 0,05$	79
Gráfico 22 - Níveis de IFN- γ em camundongos C57BL/6 infectados por via oral com 20 cistos da cepa D8 de <i>T. gondii</i> aos 45 dias após a infecção (C57BL/6 45 d.a.i.), 180 dias após a infecção (C57BL/6 180 d.a.i.) e não infectado (NI). Os valores mostram a média de quatro a oito animais.....	84

LISTA DE TABELAS

- 1 - Marcadores utilizados na PCR-RFLP em segmentos de DNA de *T. gondii*.....27
- 2 - Percentagem de sobrevivência e número de cistos cerebrais em camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 dias com as cepas EGS, CH3 e N. O bioensaio foi avaliado por sobrevivência, presença de cistos cerebrais e anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfeção....37
- 3 - Percentagem de sobrevivência e número de cistos cerebrais em camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N. O bioensaio foi avaliado por sobrevivência, presença de cistos cerebrais e anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfeção....38
- 4 - Genotipagem dos loci *cS10-A6* e *L363* de cepas de *T. gondii* por PCR-RFLP. DNA foi extraído de taquizoítos obtidos do peritônio de camundongos “swiss” inoculados por via intraperitoneal 5-7 dias antes com cistos cerebrais de camundongos BALB/C sobreviventes primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias ou 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N.....41
- 5 - Presença de necrose, número médio de nódulos gliais e infiltrados inflamatórios perivasculares em grupos de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N do *T. gondii*.....58
- 6 - Presença de necrose, número médio de nódulos gliais e infiltrados inflamatórios perivasculares em grupos de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 180 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N do *T. gondii*.....58
- 7 - Percentagem de sobrevivência e número de cistos cerebrais em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 dias com as cepas EGS, CH3 e N. O bioensaio foi avaliado por sobrevivência, presença de cistos cerebrais e anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfeção....66
- 8 - Percentagem de sobrevivência e número de cistos cerebrais em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N. O bioensaio foi avaliado por sobrevivência, presença de cistos cerebrais e anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfeção....67
- 9 - Genotipagem dos loci *cS10-A6* e *L363* de cepas de *T. gondii* por PCR-RFLP. DNA foi extraído de taquizoítos obtidos do peritônio de camundongos “swiss” inoculados por via intraperitoneal 5-7 dias antes com cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 sobreviventes primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias ou 180 dias com as cepas EGS e CH3.....69
- 10 - Presença de necrose, número médio de nódulos gliais e infiltrados inflamatórios perivasculares em grupos de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N do *T. gondii*.86
-

11 - Presença de necrose, número médio de nódulos gliais e infiltrados inflamatórios perivasculares em grupos de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 180 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N do <i>T. gondii</i>	86
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD-	“Cluster of differentiation”
CEBIO-	Centro de Bioterismo
Con-A-	Concanavalina A
DMSO-	“Dimethyl sulfoxide” (dimetisulfóxido)
DNA -	“Deoxyribonucleic acid” (Ácido desoxirribonucléico)
DNTPs	“Deoxynucleoside triphosphates” (Deoxinucleosídeo trifosfato)
DP -	Desvio Padrão
ELISA -	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (Ensaio Imunoenzimático)
<i>GRA6</i> -	“Dense granule antigen 6” (Antígeno de grânulo denso 6)
HE -	Hematoxilina e Eosina
HIV -	“Human Immunodeficiency Virus” (Vírus da Imunodeficiência humana)
H ₂ SO ₄ 4N-	Ácido Sulfúrico 4N
IgG -	Imunoglobulina G
IgG1 -	Imunoglobulina G1
IgG2a -	Imunoglobulina G2a
IgG2b -	Imunoglobulina G2b
IgG2 -	Imunoglobulina G2
IgG3 -	Imunoglobulina G3
IgG4 -	Imunoglobulina G4
IgM -	Imunoglobulina M
IgA -	Imunoglobulina A
IL-2 -	Interleucina 2
IL-4 -	Interleucina 4
IL-5 -	Interleucina 5
IL-6 -	Interleucina 6
IL-10 -	Interleucina 10
IL-12 -	Interleucina 12
IL-13 -	Interleucina 13
IL-18 -	Interleucina 18
INF- γ -	Interferon gama
i. p. -	Intraperiotoneal
kDa -	“kilodalton”

- LD- “Lethal dose” (dose letal)
- MHC - “Major histocompatibility complex” (Complexo histocompatibilidade principal)
- NK - “Natural killer” (Matadoras naturais)
- NO - “Nitric oxide” (Óxido nítrico)
- PAGE- “Polyacrylamide gel” (Gel de poliacrilamida)
- PCR - “Polymerase chain reaction” (Reação em cadeia da polimerase)
- PBS - “Phosphate buffer saline” (salina tamponada com fosfato)
- PBS-T - “Phosphate Buffered Saline Tween-20” (Tampão fosfato de sódio pH 7,2, com 0,05% de tween 20)
- RFLP - “Restriction fragment length polymorphisms” (Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição)
- RPMI - Meio de cultura desenvolvido no “Roswell Park Memorial Institute”
- SAG1* - “Surface antigen 1” (Antígeno de superfície 1)
- SAG2* - “Surface antigen 2” (Antígeno de superfície 2)
- SAG3* - “Surface antigen 3” (Antígeno de superfície 3)
- SFB- Soro fetal bovino
- SDS - “Sodium dodecyl sulfate” (Duodecil sulfato de sódio)
- STAg - “Soluble tachyzoite antigen” (Extrato solúvel de *T. gondii*)
- TGF- β - “Transforming growth factor beta” (Fator de crescimento transformante beta)
- TH - “T helper” (células T auxiliaadoras)
- TH1 - “T helper 1” (células T auxiliaadoras – tipo 1)
- TH2 - “T helper 2” (células T auxiliaadoras – tipo 2)
- TMB- Tetrametilbenzidina
- TNF- α - “Tumor necrosis factor alfa” (Fator de necrose tumoral alfa)
-

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2 - Distribuição e vias de infecção do <i>T. gondii</i>	3
1.3 - Caracterização genotípica das cepas de <i>T. gondii</i>	5
1.4 - Evolução da infecção pelo <i>T. gondii</i> em camundongos com diferentes “background” genéticos.....	6
1.5 - Resposta imune contra <i>T. gondii</i>	8
1.5.1 - Resposta imune inata e celular	8
1.5.2 - Resposta imune humoral	11
1.6 - Resposta imune e virulência de cepas de <i>T. gondii</i>	12
1.7 - Reinfecção pelo <i>T. gondii</i>	14
2 – JUSTIFICATIVA	17
3 – OBJETIVOS	18
3.1 - Objetivo Geral.....	18
3.2 - Objetivos específicos.....	18
4 - MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 - Parasitos.....	19
4.2 - Camundongos.....	19
4.3 - Infecção Primária dos Camundongos.....	19
4.4 - Desafio de camundongos BALB/c com as cepas EGS, CH3 e N de <i>T. gondii</i> 45 dias após a infecção primária com a cepa D8.....	20
4.5 - Desafio de camundongos BALB/c com as cepas EGS, CH3 e N de <i>T. gondii</i> 180 dias após a infecção primária com a cepa D8.....	21
4.6 – Desafio de camundongos C57BL/6 com as cepas EGS, CH3 e N de <i>T. gondii</i> 45 dias após a infecção primária com a cepa D8.....	21
4.7 – Desafio de camundongos C57BL/6 com as cepas EGS, CH3 e N de <i>T. gondii</i> 180 dias após a infecção primária com a cepa D8.....	22
4.8. - Bioensaio.....	24
4.9 - Tipagem genética de re-isolados de <i>T. gondii</i>	24
4.9.1 - Extração de DNA	24
4.9.2 - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP)	25
4.10 – ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”).....	27
4.11 - “Western Blotting”.....	28
4.12 – Dosagem de IFN- γ e IL-10 no sobrenadante de esplenócitos de camundongos primo infectados com a cepa D8.....	29
4.12.1 - Cultura de células do baço de camundongos infectados com a cepa D8 do <i>T. gondii</i>	29
4.12.2 - Dosagem de Citocinas	30
4.13 – Avaliação Histopatológica.....	31
4.14 - Análise Estatística.....	31
5 – RESULTADOS	33
5.1 – Avaliação da mortalidade e do bioensaio de camundongos BALB/c desafiados aos 45 e 180 dias após a primo infecção com a cepa D8.....	33
5.1.1 - Desafio 45 dias após a infecção primária	33
5.1.2 - Desafio 180 dias após a infecção primária	34

5.2 - Tipagem genética de re-isolados de <i>T. gondii</i> de camundongos BALB/c desafiados 45 e 180 dias após primo infecção	39
5.2.1 – Camundongos desafiados aos 45 dias	39
5.2.2 – Camundongos desafiados aos 180 dias	39
5.3 - Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 e 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N	45
5.3.1 - IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos desafiados aos 45 dias após a primo infecção com a cepa D8	45
5.3.2 - IgM e IgA em camundongos desafiados aos 45 dias após primo infecção com a cepa D8	45
5.3.3 - IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos BALB/c desafiados aos 180 dias após primo infecção com a cepa D8	46
5.3.4 - IgM e IgA em camundongos BALB/c desafiados aos 180 dias após primo infecção com a cepa D8	46
5.3.5 – Anticorpos IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA em camundongos BALB/c aos 45 e 180 dias de infecção apenas com a cepa D8	46
5.4 - Avaliação comparativa do reconhecimento antigênico de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N de <i>T. gondii</i> utilizando a técnica de “Western-Blotting”	52
5.5 - Dosagem de INF- γ e IL-10 de camundongos BALB/C após 45 e 180 dias da infecção com a cepa D8	54
5.6 – Avaliação histopatológica do cérebro de camundongos BALB/c infectados com <i>T. gondii</i>	56
5.7 – Avaliação da mortalidade e do bioensaio de camundongos C57BL/6 desafiados aos 45 e 180 dias após a primo infecção com a cepa D8	61
5.7.1 - Desafio 45 dias após a infecção primária	61
5.7.2 - Desafio 180 dias após a infecção primária	61
5.8 - Tipagem genética de re-isolados de <i>T. gondii</i> em camundongos C57BL/6 desafiados 45 e 180 dias após primo infecção	68
5.8.1 – Camundongos desafiados aos 45 dias	68
5.8.2 – Camundongos desafiados aos 180 dias	68
5.9 - Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 e 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N	73
5.9.1 - IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos desafiados aos 45 dias após a primo infecção com a cepa D8	73
5.9.2 - IgM e IgA em camundongos desafiados aos 45 dias após primo infecção com a cepa D8	73
5.9.3 - IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos desafiados aos 180 dias após primo infecção com a cepa D8	73
5.9.4 - IgM e IgA em camundongos desafiados aos 180 dias após primo infecção com a cepa D8	74
5.9.5 – IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA em camundongos aos 45 e 180 dias de infecção com a cepa D8	74
5.10 - Avaliação comparativa do reconhecimento antigênico de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N do <i>T. gondii</i> utilizando a técnica de “Western-Blotting”	80
5.11 - Dosagem de INF- γ e IL-10 de camundongos C57BL/6 45 e 180 dias da infecção com a cepa D8	83
5.12 - Avaliação histopatológica do cérebro de camundongos C57BL6 infectados com <i>T. gondii</i>	85
6 – DISCUSSÃO	89
7 – CONCLUSÕES	99
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 – INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Sub-ordem Eimeriina, Família Sarcocystidae e Sub-família Toxoplasmatinae (LEVINE *et al.* 1980). O *T. gondii* foi descrito pela primeira vez em 1908 na África do Norte em um roedor da espécie *Ctenodactylus gondi* Pallas, 1778 por Nicolle & Manceaux. No mesmo ano, no Brasil o *T. gondii* foi encontrado em coelho (SPLENDORE, 1908), indicando que este parasito possuía o potencial de infectar pelo menos duas espécies de hospedeiros em regiões geográficas totalmente distintas. O *T. gondii* foi, posteriormente, encontrado parasitando vários outros vertebrados. Segundo Dubey & Beattie (1988), o *T. gondii* infecta animais homeotérmicos (aves e mamíferos) inclusive o homem.

No final da década de 60 foi evidenciado o ciclo de vida heteroxeno do *T. gondii* através do encontro de uma forma evolutiva do protozoário em fezes de gato (oocisto) capaz de induzir infecção em outros mamíferos e aves através da ingestão. O ciclo coccidiano deste parasito foi elucidado em 1970, através da descoberta dos estágios sexuais no intestino de gatos ((FRENKEL *et al.*, 1970; DUBEY & BEATTIE, 1988).

1.1 - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteroxeno, os hospedeiros intermediários são provavelmente todos os animais homeotérmicos, incluindo o homem (TENTER *et al.*, 2000). No ciclo de vida do *T. gondii* os animais da família Felidae são os únicos que podem atuar como hospedeiros definitivos (DUBEY, 1986). Entretanto, os felídeos podem atuar também como hospedeiros intermediários (DUBEY & BEATTIE, 1988).

Na fase aguda da infecção é encontrada a forma proliferativa denominada taquizoíto. Os taquizoítos se multiplicam rapidamente em qualquer célula nucleada do hospedeiro intermediário e nas células epiteliais intestinais do hospedeiro definitivo (DUBEY *et al.*, 1998). O *T. gondii* é particularmente competente para atravessar as barreiras teciduais como a barreira hemato-cefálica, para entrar no sistema nervoso central e a placenta para transmissão ao feto (CARRUTHERS, 2002). Já na fase crônica da infecção são encontrados os bradizoítos. Os bradizoítos se multiplicam lentamente dentro dos cistos teciduais. Estes cistos são encontrados em tecido neural e muscular, principalmente em cérebro, olhos, músculos

esqueléticos e cardíacos. Entretanto os cistos teciduais podem também se desenvolver nas vísceras incluindo pulmão, fígado e rins (DUBEY, 1986).

O hospedeiro intermediário se infecta, principalmente, pela ingestão de oocistos ou cistos. No intestino a parede é rompida e ocorre, respectivamente, a liberação de esporozoítos ou bradizoítos que penetram nas células epiteliais (KASPER *et al.*, 2004). Após a infecção das células epiteliais intestinais os estágios infectantes (esporozoítos e bradizoítos) transformam-se em taquizoítos, que iniciam uma rápida multiplicação por endodiogenia dentro do vacúolo parasitóforo intracelular (DENKERS & GAZZINELLI, 1998).

A invasão das células pelo *T. gondii* envolve a secreção do conteúdo de organelas do complexo apical. Segundo Carruthers & Sibley (1997) a ligação do parasito à célula hospedeira dispara a liberação de proteínas dos micronemas para adesão e re-orientação e, em seguida, são liberadas as proteínas de roptrias que promovem a invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira formando o vacúolo parasitóforo. As proteínas dos grânulos densos são liberadas mais tarde após o parasito estar completamente envolvido pelo vacúolo parasitóforo e irão participar efetivamente na constituição e nas modificações posteriores sofridas por este vacúolo. De acordo com Lemgruber e colaboradores (2008), a liberação de proteínas dos grânulos densos possivelmente ocorre em diferentes períodos do desenvolvimento do parasito no vacúolo parasitóforo. Estes autores sugerem que o vacúolo parasitóforo é uma estrutura dinâmica, pois é capaz de sofrer invaginações de membrana, apresentar proteínas intramembrana nos momentos iniciais da interação e manter a densidade das proteínas intramembranas durante a infecção. Estas alterações no vacúolo parasitóforo permitiriam a sobrevivência, persistência e multiplicação do parasito.

A célula hospedeira se rompe quando ela não pode mais suportar as sucessivas divisões dos taquizoítos por endogenia (DUBEY *et al.*, 1998). O parasito é, então, disseminado através do sangue e da linfa atingindo vários órgãos. A taxa de invasão e crescimento dos taquizoítos irá variar de acordo com a cepa de *T. gondii* envolvida na infecção (APPLEFORD & SMITH, 1997). Esse período inicial da infecção caracteriza a fase aguda da toxoplasmose. Posteriormente ocorre o desenvolvimento da imunidade, a proliferação de taquizoítos é controlada e os bradizoítos se desenvolvem formando os cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da infecção.

A taxa de formação dos bradizoítos varia entre as cepas virulentas para camundongos (APPLEFORD & SMITH, 1997). Acredita-se que estas variações ocorram em função das diferenças genéticas entre as cepas. Segundo Dubey e colaboradores (1998), apesar de a fase

crônica persistir por toda vida do hospedeiro, os cistos teciduais podem romper-se periodicamente, com invasão de novas células e formação de novos cistos teciduais.

Os hospedeiros definitivos se infectam pela ingestão de esporozoítos (oocisto), bradizoítos (cistos teciduais) ou taquizoítos (DUBEY, 1986). Nestes animais ocorre a fase coccidiana da infecção. Após penetrarem no epitélio intestinal os bradizoítos multiplicam-se por merogonia. As células se rompem e os merozoítos liberados penetram em células epiteliais originando formas sexuadas denominadas gametócitos. Os gametócitos dão origem aos gametas masculinos (microgametas) que são móveis e flagelados, saem da célula hospedeira para fecundar os gametas femininos (macrogametas), que permanecem no interior da célula, também originados a partir dos gametócitos. Após a fecundação ocorre a formação do zigoto que é envolto por uma parede resistente originando o oocisto (DUBEY, 1986). O oocisto não esporulado é liberado junto com as fezes para o meio ambiente. Em contato com a atmosfera ocorre a esporogonia e o oocisto se torna infectante contendo dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos. Este processo ocorre em um período de 1 a 5 dias após a excreção, dependendo das condições ambientais (DUBEY, 1986).

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

1.2 - Distribuição e vias de infecção do *T. gondii*

Segundo Dubey & Beattie (1988) a toxoplasmose é uma infecção de ocorrência mundial com alta prevalência em adultos humanos em diferentes populações. Nos Estados Unidos e no Reino Unido é estimado que 16-40% da população esteja infectada com o *T. gondii*, enquanto na América Central e do Sul e no continente Europeu estima-se uma taxa de infecção de 50-80% da população. No Brasil a prevalência da infecção com *T. gondii* também apresenta bastante variação. Coêlho e colaboradores (2003) encontraram 75% dos indivíduos com IgG específica contra *T. gondii* em um grupo de 160 doadores de sangue no Recife. Cavalcante e colaboradores (2006) observaram uma prevalência semelhante (73,3%) em 195 pessoas residentes em fazendas no estado de Rondônia. Dias e colaboradores (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 e colaboradores (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. Mais recentemente, foi observado que 191 (73.5%) índios Iauareté do estado do Amazonas apresentavam anticorpos para *T. gondii* (BÓIA *et al.*, 2008).

A maioria das infecções em humanos são assintomáticas, mas em alguns casos o *T. gondii* pode causar doença grave. A infecção por *T. gondii* pode ser adquirida através da via congênita ou pós-natal.

A transmissão congênita do *T. gondii* ocorre quando a mulher grávida está desenvolvendo a fase aguda da infecção primária e taquizoítos atravessam a placenta ativamente, o que pode resultar em conseqüências graves para o feto (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). As conseqüências patológicas para o feto são dependentes do trimestre de gestação na qual a transmissão ocorre (REMYINGTON & DESMONTS, 1990). A gravidade das manifestações clínicas para o feto pode variar desde diminuição da visão, passando pela retinocoroidite, hidrocefalia, convulsão e calcificação cerebral até casos mais graves levando ao aborto (HILL & DUBEY, 2002). A seqüela mais freqüente da toxoplasmose congênita é a doença ocular (REMYINGTON & DESMONTS, 1990).

A infecção adquirida pela via pós-natal pode ser localizada ou generalizada (HILL & DUBEY, 2002). O homem adquire a toxoplasmose principalmente pela ingestão de cistos teciduais presentes em carne crua ou mal passada (AMENDOEIRA, 1995) ou pela ingestão de água (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2006), alimentos crus ou mal lavados, contaminados com oocistos, provenientes de fezes de gato (DUBEY *et al.*, 1998), raramente por taquizoítos, ingestão de leite materno (BONAMETTI *et al.*, 1997). As infecções transmitidas por oocistos podem ser mais graves que as transmitidas através dos cistos teciduais (DUBEY & BEATTIE, 1988). O aumento dos linfonodos é a manifestação clínica mais freqüente da toxoplasmose em humanos. A linfadenopatia pode ser associada à febre, fadiga, dor muscular, dor de garganta e de cabeça (HILL & DUBEY, 2002). Apesar da infecção ser geralmente benigna, em pacientes imunodeficientes, particularmente indivíduos infectados com HIV, a encefalite é a mais importante manifestação da toxoplasmose, causando graves danos ao paciente inclusive levando a morte (GELLIN & SOAVE, 1992).

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

A caracterização genotípica do *T. gondii* tem sido feita principalmente através da PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorfism). A RFLP é uma técnica que se utiliza de endonucleases de restrição para que organismos possam ser diferenciados pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA. A RFLP permite a distinção entre dois organismos caso estes difiram na distância entre os sítios de clivagem de uma endonuclease de restrição. Como resultado final, o comprimento dos fragmentos produzidos vai diferir quando o DNA for digerido com uma enzima de restrição.

A análise genotípica da população de *T. gondii* por PCR-RFLP identifica, na Europa e EUA, o predomínio de três linhagens clonais que são designadas como cepas tipo I, II e III. (DARDÉ *et al.*, 1992; HOWE & SIBLEY, 1995). As cepas virulentas (tipo I) são letais ao camundongo no estágio agudo, independente do inóculo, enquanto as cepas tipo II e III são raramente fatais durante a fase aguda, mas causam alterações variáveis no estágio crônico (HOWE *et al.*, 1996).

Segundo Boothroyd & Grigg (2002) tem ocorrido um aumento no número de isolamentos de cepas que não se encaixam na classificação de cepas tipo I, II e III. Estas 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 e que têm sido fonte da maioria das amostras analisadas atualmente. 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 (LEHMANN *et al.*, 2000; FAZAELI *et al.*, 2000). Aspinall e colaboradores (2003) encontraram evidência de infecção mista usando a técnica de PCR-RFLP no loco *SAG2* de *T. gondii*. Foram analisadas 32 amostras oriundas de casos de toxoplasmose em humanos na Inglaterra e País de Gales. Destas, 31% apresentaram perfil semelhante às cepas tipo I e II quando digeridas com a endonuclease de restrição *RsaI*. Estas amostras foram caracterizadas como uma mistura de cepas tipo I e II. Estes autores propuseram que a hipótese mais provável para explicar a infecção mista observada é a ocorrência de ingestão simultânea de carne sem cozimento adequado derivada de animal infectado com uma cepa tipo I e de animal infectado com uma cepa II, o que facilmente iniciaria uma infecção mista.

Brandão e colaboradores (2006), utilizando a técnica de PCR-RFLP, mostraram uma prevalência de cepas tipo I e III e a ausência de cepas tipo II através da análise do loco *SAG2*

de isolados de *T. gondii* obtidos de galinha no Brasil. Estes resultados foram semelhantes ao descrito para isolados também obtidos no Brasil (DUBEY *et al.*, 2002, 2003 a, b, 2004). Em 2006, Ferreira e colaboradores analisaram 20 cepas de *T. gondii* isoladas de diferentes hospedeiros no Brasil. Estes autores foram os primeiros que utilizaram oito *loci* independentes (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *B1*, *Cb21-4*, *cS10-A6*, *GRA6* e *L363*) para classificar cepas de *T. gondii*. Todas as cepas analisadas neste estudo foram classificadas como recombinantes e divididas em 14 esquizodemas. Estes autores propuseram que a análise de somente um loco pela PCR - RFLP seria incapaz de identificar cepas híbridas no Brasil. Em seguida outros trabalhos vieram confirmar a hipótese proposta de que as cepas isoladas no Brasil são predominantemente recombinantes. Khan e colaboradores (2006) analisaram isolados clínicos humanos e de animais do Brasil utilizando a técnica de PCR-RFLP multilocus (5' *SAG2*, 3' *SAG2*, *BTUB*, *GRA6* e *SAG3*). Estes autores observaram que os isolados diferem substancialmente do que tem sido descrito para linhagens clonais e que a análise define novos haplotipos que parecem ser predominantes no Brasil. Esse padrão pode indicar que cepas de *T. gondii* no Brasil sofrem mais freqüentemente recombinação sexual o que resultaria em genótipos mistos. Resultados semelhantes foram obtidos por Belfort-Neto e colaboradores (2007), analisando isolados obtidos de suínos no estado do Paraná. Segundo estes autores as cepas apresentaram aparentemente um padrão recombinante o que não é usual em isolados obtidos na América do Norte e Europa. Dubey e colaboradores (2007), analisando isolados de galinha obtidos no Pará e Rio Grande do Sul, Brasil, pela técnica de PCR multiplex, observaram que o perfil genético de *T. gondii* no Brasil é altamente diverso e que as populações são distintas entre as diferentes localizações. Por meio do bioensaio de sangue obtido de 197 recém nascidos, IgM reagentes pós nascimento, foram obtidos 27 (13,7%) isolados de *T. gondii*, que são em sua maioria de virulência intermediária e virulentos. (Carneiro & Vitor, comunicação pessoal). O estudo genético destes isolados poderá futuramente fornecer maiores informações sobre as características das cepas comumente encontradas em casos de toxoplasmose congênita no Brasil.

1.4 - Evolução da infecção pelo *T. gondii* em camundongos com diferentes “background” genéticos

O camundongo é muito utilizado como modelo experimental em toxoplasmose, pois possuem vários atributos físicos e biológicos que os tornam modelos viáveis, como por exemplo, sua alta suscetibilidade ao *T. gondii*.

Blackwell e colaboradores (1993) observaram que a mortalidade em camundongos varia dependendo da via de infecção. Segundo Liesenfield e colaboradores (1999) a resposta imune do hospedeiro frente ao *T. gondii* também é influenciada por fatores como o inóculo, a cepa do parasito, o sexo e a genética do hospedeiro.

Segundo McLeod e colaboradores (1996) os genes do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) em camundongos têm grande influência nas conseqüências da toxoplasmose, sendo que as variações alélicas têm sido relacionadas com o fenótipo de resistência de certos genes do MHC. Suzuki e colaboradores (1991) ao utilizarem camundongos de diferentes haplótipos H-2, infectados pela via intraperitoneal com a cepa ME49, observaram que os camundongos com os alelos b ou k na região H-2D do MHC desenvolveram encefalite grave durante a fase crônica da infecção enquanto os camundongos com o alelo d foram resistentes. Ainda segundo estes autores existe forte correlação entre a ocorrência de encefalite e o número de cistos no cérebro de camundongos infectados, pois camundongos com alelos b ou k possuem expressivamente mais cistos no cérebro que os camundongos com o alelo d. Suzuki e colaboradores (1994) observaram que os genes da região D/L determinam se a encefalite ocorre, e que o gene L^d desempenha uma função crítica na resistência contra o desenvolvimento da encefalite.

Brown e colaboradores (1995) utilizando a cepa ME49 infectaram camundongos transgênicos, mutantes e recombinantes para genes da região L/D e avaliaram a carga parasitária, por meio da contagem do número de cistos no cérebro. Estes autores também observaram que a resistência à carga de cistos cerebrais estava sendo amplamente controlada pelo gene do MHC de classe I, L^d.

A função crítica do gene L^d em prevenir encefalite em camundongos geneticamente resistentes sugere uma importante função para células T CD8⁺ na resposta imune protetora contra o desenvolvimento da encefalite já que os antígenos de MHC classe I desempenham uma função primordial no reconhecimento antigênico por células T CD8⁺ (HUNTER *et al.*, 1996). Além disso, acredita-se que o produto do gene L^d apresente peptídeos protetores às células T CD8⁺, os quais seriam os responsáveis pelas diferenças na carga parasitária e na encefalite observada em camundongos resistentes e susceptíveis.

Entretanto, em um estudo realizado por Fux e colaboradores (2003), utilizando uma cepa de *T. gondii* naturalmente recombinante P-Br (tipo I-III) em comparação com a cepa ME49 (tipo II), foi observado que os camundongos C57BL/6 (H-2^b) foram resistentes e os camundongos BALB/c (H-2^d) mais susceptíveis à formação de cistos e encefalite quando

infectados por via oral com a cepa P-Br de *T. gondii*. Por outro lado, camundongos C57BL/6 inoculados com a cepa ME49 foram mais susceptíveis à formação de cistos e encefalite que camundongos BALB/c inoculados com a mesma cepa. Além disso, camundongos C57BL/6 infectados com a cepa P-Br foram resistentes às lesões intestinais causadas pela toxoplasmose em comparação à cepa ME49. Estes resultados foram também observados em linhagens de camundongos isogênicas, demonstrando que o haplótipo “d” do MHC não é primariamente envolvido na resistência à formação de cistos e encefalite durante a infecção com a cepa tipo I-III e, portanto, difere da resistência à cepa tipo II. Este estudo vem demonstrar que mais que um simples mecanismo de resistência deve ser considerado para explicar os controles genéticos de susceptibilidade ao *T. gondii*.

1.5 - Resposta imune contra *T. gondii*

1.5.1 - Resposta imune inata e celular

A resposta imune contra *T. gondii* é complexa com diversas interações, variando em função da linhagem de camundongo estudada, dos locais anatômicos analisados, da cepa do parasito utilizada e também da rota de infecção (YAP *et al.*, 2006). Entretanto, vários pontos em comum têm sido observados através do estudo em vários modelos experimentais (MENZIES *et al.*, 2008). 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). Os neutrófilos são uma das primeiras células a chegarem ao local da infecção com *T. gondii* (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). Após a estimulação com *T. gondii*, neutrófilos de humanos e camundongos produzem IL-12, TNF- α e várias quimiocinas (DENKERS *et al.*, 2004). Portanto, as células polimorfonucleares no local da infecção podem participar do recrutamento e ativação de outras células imunes como macrófagos e células dendríticas. Os macrófagos e as células dendríticas também produzem IL-12 após infecção com *T. gondii* (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). Segundo Gazzinelli e colaboradores (1993) a síntese de IL-12 é essencial na indução da produção de IFN- γ por células NK. O TNF- α desempenha claramente uma ação sinérgica com o IL-12 na indução da produção de IFN- γ pelas células NK (GAZZINELLI *et al.*, 1993). Entretanto, o TNF- α isoladamente não é capaz de induzir a produção de IFN- γ (D'ANDREA *et al.*, 1993). Os macrófagos além de produzirem IL-12 também irão desenvolver uma

atividade citotóxica contra o *T. gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1996). A produção do INF- γ promove a redução ou eliminação do parasito pelos macrófagos, células dendríticas e enterócitos (BUZONI-GATEL & WERTS, 2006). A inibição da replicação do *T. gondii* ou sua destruição são resultados de mecanismos efetores: o mecanismo oxidativo (MURRAY & COHN, 1979), e os mecanismos não-oxidativos, representados principalmente pela produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ (ADAMS *et al.*, 1990). O NO também está envolvido na fase crônica por atuar inibindo a proliferação dos parasitos no cérebro. Existe também um mecanismo não dependente de oxigênio, como a indução da idoleamine 2,3 dioxygenase pelo IFN- γ a qual degrada o triptofano requerido para o crescimento do parasito (PFEFFERKORN *et al.*, 1986). A 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).

Após a infecção com *T. gondii* ocorre um estímulo da secreção de citocinas pró-inflamatórias como INF- γ , IL-12 e TNF- α e antiinflamatórias ou regulatórias como TGF- β e IL-10 (GAZZINELLI *et al.*, 1996). A produção inicial de IFN- γ e outras citocinas pro inflamatórias é crucial no desenvolvimento da resposta imune adaptativa contra o *T. gondii*. O IFN- γ 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 potencializa os efeitos de IL-10 e/ou antagoniza a diferenciação das células Th no fenótipo Th1, sugerindo se tratar de uma importante citocina na prevenção de uma exacerbação da resposta Th1 induzida pelo parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1992).

Durante a fase aguda da toxoplasmose a citocina regulatória IL-10 realiza várias funções na supressão da resposta imune celular em humanos e camundongos (LANG *et al.*, 2007). IL-10 inibe a ativação de macrófagos, inibe a síntese de IFN- γ pelas células T e NK e previne a diferenciação de clones Th1 por meio da inibição da síntese de IL-12 por macrófagos (D'ANDREA *et al.*, 1993). A imunossupressão exercida por IL-10 evita a super-inflamação que eventualmente levaria o hospedeiro à morte facilitando a sobrevivência do parasito (NEYER *et al.*, 1997). Esses resultados fornecem clara evidência que a indução de imunossupressão pela IL-10 após infecção com *T. gondii* é benéfica tanto para o parasito

quanto para o hospedeiro e favorece uma relação estável entre parasito e hospedeiro (LANG *et al.*, 2007). Os níveis relativos de IL-10 e INF- γ produzidos por células T no curso de uma resposta imune são cruciais para determinar se a eliminação do patógeno ocorre com lesões mínimas ou se uma infecção persistente se desenvolve (O’GARRA & VIEIRA, 2007).

Os macrófagos e as células dendríticas apresentam antígenos de *T. gondii* aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ induzindo um fenótipo tipo Th1 pela secreção de IL-12 (CORREA *et al.*, 2007). O INF- γ possui uma ação sinérgica com IL-12 no direcionamento da diferenciação das células de fenótipo Th em fenótipo Th1. Segundo Araújo (1991) a população de linfócitos T CD4⁺ é essencial para o desenvolvimento da resistência em camundongos durante a fase inicial da infecção. Esta resistência é relacionada à resposta tipo 1 promovida pela produção inicial de INF- γ pelas células NK (GAZZINELLI *et al.*, 1993).

Os linfócitos Th1 CD4⁺ e linfócitos T citolíticos CD8⁺ são os principais envolvidos na resistência dos hospedeiros à infecção por *T. gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1991). As células T CD4⁺ e CD8⁺ são vitais para fornecer uma imunidade protetora e sobrevivência durante a infecção crônica (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Segundo Combe e colaboradores (2005) as células T CD8⁺ são essenciais para uma imunidade efetiva contra o parasito e as células T CD4⁺ desempenham importante função sinérgica para ajudar a manter uma resposta eficiente das células T CD8⁺. Além disso, a imunidade exercida pelas células T CD8⁺ parece ser crítica para controlar e impedir a reativação de infecção latente com *T. gondii*. Os linfócitos T são uma fonte crítica de INF- γ durante o estágio crônico da infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1992).

Os linfócitos T CD8⁺ ativados pela IL-12 secretada pelos linfócitos T CD4⁺ exercem uma atividade citotóxica contra taquizoítos ou células infectadas com *T. gondii* (SUBAUSTE *et al.*, 1991). Lütjen e colaboradores (2006) observaram que a frequência de células T CD8 em camundongos em fase aguda e crônica da toxoplasmose é independente de células T CD4. Entretanto, a depleção de células T CD4 em camundongos na fase crônica da toxoplasmose resultou na redução da produção de INF- γ pelas células T CD8 indicando que um contínuo suporte de células CD4 é necessário para manter uma atividade funcional ótima das células T CD8 no cérebro. Estes autores observaram também que a depleção de células T CD4 em camundongos em fase crônica da toxoplasmose, em paralelo com a reinfeção com baixas doses de cistos de *T. gondii*, resultou em uma expansão de células T CD8 específicas para *T. gondii* enquanto os animais controle não apresentaram esse aumento. Estes resultados indicam que as células T CD8 é que limitam a expansão do parasito após a reinfeção.

1.5.2 - Resposta imune humoral

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 ou por meio do aumento da fagocitose pelos macrófagos (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004).

As imunoglobulinas M (IgM) são as primeiras a serem produzidas e 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 (CORREA *et al.*, 2007). Segundo Gorgievski-Hrisoho e colaboradores (1996) esta imunoglobulina, apesar de estar relacionada à fase aguda da infecção, foi encontrada até seis meses após a infecção em mulheres grávidas. IgM é a melhor ativadora do sistema de complemento e devido a sua estrutura é capaz de excelente aglutinação e alto nível de citotoxicidade (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004).

A imunoglobulina A (IgA) é produzida logo após IgM e é observada em duas formas: IgA de mucosa que é encontrada nas secreções de muco e IgA do plasma. Esta imunoglobulina persiste por 6-7 meses, entretanto varia bastante na quantidade e duração em adultos e recém-nascidos infectados via congênita (GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1996). O sistema imune na mucosa possui extensa população de células linfóides que rapidamente entram em contato com o parasito durante sua penetração intestinal. A estimulação eficiente da resposta na mucosa pode ser altamente válida no controle da infecção com *T. gondii* pela via oral (DECOSTER, 1996). A resposta de IgA regularmente surge antes de IgG e sua produção é aumentada por estímulo de IL-10 e TGF- β (DEFRANCE *et al.*, 1992). Os anticorpos IgA constituem mais de 80% de todos os anticorpos associados à mucosa e tecido (CHARDÈS AND BOUT, 1993). Segundo Denkers & Gazzinelli (1998) os anticorpos deste isotipo podem ser importantes para se evitar a reinfecção com *T. gondii*.

As imunoglobulinas G (IgG) são compostas de várias subclasses. Em camundongos estão presentes as subclasses IgG, IgG2a, IgG2b e IgG1 e em humanos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Segundo Fiorentino e colaboradores (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. 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. Vários estudos da toxoplasmose humana têm demonstrado que IgG1 é ativada primeiro e é dominante no plasma enquanto IgG2, IgG3 e IgG4 apresentam padrão bastante variável (CORREA *et al.*, 2007). Estas imunoglobulinas são capazes de promover uma citotoxicidade anticorpo-dependente ou opsonização, em função de receptores Fc presente em macrófagos e, em células polimorfonucleares ou por citólise, mediada por complemento ou células NK. Os principais alvos de IgG são os antígenos de superfície do parasito.

1.6 - Resposta imune e virulência de cepas de *T. gondii*

Os eventos iniciais na resposta imune ao *T. gondii* são cruciais ao controle da fase aguda da infecção. Segundo Mordue e colaboradores. (2001) este controle durante as infecções não letais, com cepas avirulentas, tem sido muito estudado no modelo murino e é altamente dependente de INF- γ e da resposta das citocinas Th1. Enquanto as cepas avirulentas de *T. gondii* são geralmente bem controladas pela resposta imune, cepas virulentas são letais para camundongos, sugerindo que elas induzem um controle imune inadequado ou são dotadas de propriedades destrutivas que causam lesão diretamente nos tecidos. Estes mesmos autores demonstraram que a habilidade das cepas virulentas de causar infecções letais em camundongos não é devido à destruição direta causada pelo parasito e nem a taxas de resposta imune ineficiente e sim a uma super indução de citocinas inflamatórias. Infecção de camundongos com baixas doses de parasitos de uma cepa avirulenta resultou em uma resposta imune caracterizada por níveis moderados de INF- γ , IL-12 e TNF- α , o que levou ao controle da replicação dos parasitos e mínimas alterações teciduais. Em notável contraste, infecções letais foram associadas com indução de níveis extremamente elevados de IL-18, IFN- γ e IL-12. Segundo Sibley e colaboradores (2002) os altos níveis de citocinas Th1 não ocorrem devido à ausência de IL-10, reguladora da produção de citocinas Th1, pois esta citocina está substancialmente elevada no plasma durante a infecção letal. Carson e colaboradores (2000) observaram que a co-administração diária de IL-18 e IL-12 em camundongos de diferentes linhagens resulta em uma resposta sistêmica inflamatória que é letal em questão de dias com pronunciada injúria no fígado, pulmão e intestinos. A combinação de IL-18 e IL-12 é um estímulo potente para a secreção de TNF- α e INF- γ “in vitro”, o que pode ser a origem da toxicidade observada nos camundongos (FEHNIGER *et al.*, 1999). Mordue e colaboradores (2001) neutralizaram a citocina IL-18 em camundongos infectados com taquizoítos da cepa virulenta RH. A neutralização desta citocina prolongou a sobrevivência dos camundongos,

mas não foi capaz de impedir a morte destes animais. A neutralização do TNF- α ou do IFN- γ , isoladamente, também não foi capaz de proteger o camundongo da infecção letal. Estes resultados sugerem que efeitos cumulativos de altos níveis de diferentes mediadores inflamatórios é que vão contribuir para a morte (MORDUE *et al.*, 2001). Portanto, a letalidade está associada com níveis excessivos de citocinas Th1, particularmente IL-18 e IFN- γ , no plasma. O IFN- γ provavelmente está associado ao desenvolvimento de necroses e contribui para a morte dos animais, provavelmente devido à indução da produção de NO. A superprodução de NO causaria alterações histopatológicas no hospedeiro (LIESENFELD *et al.*, 1999). Por outro lado, Taylor e colaboradores (2006) propuseram que a expressão alélica e o nível de expressão da proteína ROP18 determinam a virulência e também atua de forma a mediar a patogênese durante a infecção com *T. gondii*.

Esses estudos revelaram que a virulência aguda em *T. gondii* ocorre por um mecanismo paradoxal. Infecções com cepas virulentas induzem superprodução de citocinas Th1 que normalmente são protetoras, mas que aqui, estão levando à letalidade. Enquanto a causa da morte permanece desconhecida, é possível que níveis extremamente elevados destas citocinas causem um aumento da permeabilidade vascular que levaria à falência múltipla dos órgãos (SIBLEY *et al.*, 2002).

A fase crônica da toxoplasmose é caracterizada pela presença de cistos de *T. gondii* principalmente no cérebro. A resposta imune é essencial para manutenção de uma infecção crônica latente (CARRUTHERS & SUZUKI, 2007). Em modelos murinos de infecção com *T. gondii* tem sido demonstrado que INF- γ é essencial para a prevenção da reativação e desenvolvimento de encefalite (GAZZINELLI *et al.*, 1992). A principal fonte de INF- γ são as células T que infiltram no cérebro após a infecção (SUZUKI *et al.*, 1988). As células T CD8⁺ são essenciais para uma imunidade efetiva contra o parasito e prevenção do desenvolvimento de encefalite e as células T CD4⁺ desempenham importante função sinérgica para ajudar a manter uma resposta eficiente das células T CD8⁺ (COMBE *et al.*, 2005). Welter e colaboradores (2007) confirmam a importância de uma resposta Th1 para a resistência à encefalite pelo *T. gondii* principalmente na presença de INF- γ . Neste trabalho, quando camundongos BALB/c resistentes, à encefalite, são pré-infectados com o ácaro *Myocoptes musculus*, tornam-se susceptíveis à infecção com *T. gondii*. O mecanismo imune induzido por *M. musculus* altera o nível de produção de INF- γ e, mesmo 14 dias após a infecção com *T. gondii*, os níveis desta citocina são baixos. Estes autores hipotetizam que a resposta Th2

desenvolvida durante a infestação pelo ectoparasito pode ser prejudicial ao controle de resistência do hospedeiro frente ao *T. gondii*.

1.7 - Reinfecção pelo *T. gondii*

Segundo Filisetti & Candolfi (2004) a persistência dos linfócitos T de memória na toxoplasmose humana é um fato estabelecido. Além disso, em humanos é aceito que a primo infecção da gestante protege o feto num evento de subsequente reinfecção durante a gravidez. Em adição, os anticorpos anti-*T. gondii* permanecem detectáveis por toda a vida do hospedeiro. É provável que a persistência de linfócitos T de memória seja garantida pela ruptura regular de cistos intracelulares ou talvez por recorrentes infecções por meio da alimentação.

Entretanto, em humanos têm sido relatados casos de toxoplasmose congênita em mulheres em fase crônica da toxoplasmose e imunocompetentes, o que tem sugerido a possibilidade de reinfecção em gestantes. Hennequin e colaboradores (1997) relataram o caso de um recém-nascido que apresentava catarata densa no olho esquerdo e coriorretinite macular no olho direito. A criança apresentou altos títulos de IgG anti- *T. gondii* associado com IgM e IgA específicos. A mãe apresentava, na quarta e décima semanas de gestação, sorologia anti-*T. gondii* compatível com infecção adquirida antes da gestação: 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, 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.

Gavinet e colaboradores (1997) relataram caso de retinocoroidite em um recém-nascido com anticorpos específicos IgG e IgM, cuja mãe já era imune para *T. gondii* antes da gravidez. No soro materno foi observado aumento de IgG e surgimento de IgM e IgA. A mãe relatou ter tido febre uma semana após ter entrado em contato com gatos. Os autores concluíram que a mulher provavelmente se reinfecou pela ingestão de oocistos. Reativação da infecção por *T. gondii* em pacientes imunocompetentes ou imunodeficientes geralmente não induzem nova produção de IgM e IgA. Os autores hipotetizam que a ingestão de cistos teciduais de *T. gondii* em carnes mal cozidas não protegem contra reinfecção por oocistos.

Dollfus e colaboradores (1998) relataram o caso de um recém-nascido com lesões oculares graves por toxoplasmose congênita, nascido de mãe previamente imune para *T. gondii*. A mãe era imunocompetente, descartando-se a possibilidade de reativação por imunodeficiência e sugerindo a possibilidade de reinfecção.

Silveira e colaboradores (2003) observaram um recém-nascido com retinocoroidite necrosante focal, característica de toxoplasmose, bem como sorologia positiva para IgG e IgM, nascido de uma mãe com um histórico de toxoplasmose crônica de 20 anos atrás, inclusive com cicatriz macular devido ao *T. gondii*. Os autores sugerem que grávidas em fase crônica da toxoplasmose, com lesão ocular e IgG anti- *T. gondii* também estão sob risco de transmitir o parasito ao feto. Mais recentemente, Kodjikian e colaboradores (2004) relataram um caso de toxoplasmose congênita em recém-nascido de mãe imunocompetente e sugerem que este fato ocorreu por reinfecção da mãe ou por reativação da infecção pré-existente.

Evidências de reinfecção também podem ocorrer em casos de toxoplasmose pós-natal. Coutinho e colaboradores (1982) relataram um caso provável de reinfecção em três irmãos com toxoplasmose adquirida. As crianças apresentavam títulos para IgG de 1:1024, 1:64 e 1:16. A primeira criança apresentava febre e linfadenopatia. No ano seguinte as três crianças apresentavam linfadenopatia e títulos para IgG variando entre 1:4096 e 1:16000. Ao mesmo tempo, outros dois irmãos apresentaram títulos de 1:1024 e 1:4096 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. Estes autores consideraram a hipótese de reinfecção nos três irmãos e não uma reativação simultânea, pois a toxoplasmose aguda no segundo ano ocorreu ao mesmo tempo nos dois outros irmãos não infectados no primeiro ano. Segundo Dao e colaboradores (2001) estes 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.

Em 1969, De Roever-Bonnet demonstrou que a toxoplasmose congênita pode ocorrer em camundongos e “hamsters” cronicamente infectados com *T. gondii* e reinfectados durante a gravidez com diferentes cepas. Araújo e colaboradores (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. Estes 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. O

bioensaio foi a técnica utilizada para determinar a ocorrência de reinfecção. Através destes experimentos os autores demonstraram que a resposta imune celular de camundongos em fase crônica da toxoplasmose, infectados com a cepa ME49 não foi capaz de prevenir, após o desafio, a invasão do cérebro destes animais pelas cepas C56 e R-C56 e a formação de novos cistos cerebrais. Hassan e colaboradores (1999) observaram um aumento de anticorpos IgA e IgM em ratos reinfectados com *T. gondii* na presença de IgG da infecção primária. A resposta imune estabelecida em função de uma infecção primária pode não ser suficiente para prevenir doença e mortalidade após uma reinfecção. Portanto, 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 (ARAÚJO *et al.*, 1997).

Dao e colaboradores (2001) testaram a hipótese de reinfecção usando cepas de diferentes genótipos clonais: a cepa Ned (tipo III), a cepa 76K (tipo II) e a cepa Prußgal derivada da cepa Prugniaud (tipo II). Esta cepa foi transfectada com o gene da β galactosidase de *Escherichia coli*. Com a inserção deste gene os cistos da cepa Prußgal adquiriam cor azul após coloração, permitindo desta forma a identificação dos cistos das diferentes cepas no cérebro de um mesmo camundongo. Através destes experimentos os autores observaram que o resultado da reinfecção depende do genótipo da cepa utilizada, sugerindo não haver reinfecção quando usadas duas cepas de mesmo genótipo e ocorrendo reinfecção quando as cepas utilizadas eram de genótipos diferentes. Já Freyre e colaboradores (2004) avaliando a reinfecção por *T. gondii* em ratos concluíram que não há relação entre proteção e genótipo das cepas utilizadas pois 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 também do tipo II (Elg, Bear e M3). Dzitko e colaboradores (2006) utilizando métodos sorológicos (ELISA e Imunoblot) como parâmetros no reconhecimento da reinfecção por *T. gondii* enfatizaram a importância da diferença das cepas na patogênese e também o fato de que ainda não está estabelecido se a proteção imune contra reinfecção é estritamente genótipo-específico.

Estas observações sugerem que alguns casos de toxoplasmose aguda em indivíduos com evidência sorológica de infecção prévia podem ser devido à reinfecção, especialmente quando não há enfraquecimento do sistema imune em função de doença ou terapia concomitante.

2 – JUSTIFICATIVA

O *T. gondii* é um parasito de distribuição mundial e que infecta vasto número de hospedeiros, inclusive o homem. A observação experimental de que a toxoplasmose aguda pode ocorrer em hospedeiros imunocompetentes após uma reinfecção com outra cepa ressalta a importância das diferenças entre as cepas na patogênese da toxoplasmose. A ocorrência da reinfecção levanta a hipótese de que a resposta imune desenvolvida após uma infecção primária não seja suficiente para proteger totalmente o indivíduo contra a reinfecção com o *T. gondii*. Caracterizar a resposta imune durante este processo, bem como a participação do genótipo do hospedeiro e do parasito seria de grande importância para o entendimento da susceptibilidade ou da resistência do hospedeiro à reinfecção pelo *T. gondii*. Além disso, os experimentos demonstrando a ocorrência da reinfecção por *T. gondii* ainda são raros e pouco conclusivos e a cinética deste fenômeno precisa ser investigada. A hipótese de que a ocorrência da reinfecção por *T. gondii* está relacionada ao genótipo do parasito poderá alterar o processo de acompanhamento de mulheres grávidas em fase crônica da doença.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Estudar a reinfecção em camundongos inoculados com cepas de *T. gondii* isoladas no Brasil classificadas como de genótipo recombinante e pertencentes a distintos esquizodemas.

3.2 - Objetivos específicos

No modelo de reinfecção proposto pretende-se avaliar:

3.2.1 - A mortalidade e o número de cistos cerebrais em animais desafiados em relação aos animais primo infectados durante a fase crônica recente (45 dias) e fase crônica avançada (180 dias);

3.2.2 - A ocorrência de reinfecção nas linhagens de camundongos: BALB/c e C57BL/6;

3.2.3 - O tipo genético dos parasitos presentes no cérebro dos camundongos sobreviventes após o desafio;

3.2.4 - A cinética de produção de anticorpos IgA, IgM, IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a;

3.2.5 - A produção de citocinas (IL-10 e INF- γ) em camundongos aos 45 e 180 após a primo infecção com *T. gondii*;

3.2.6 - Alterações histopatológicas em cérebros de animais desafiados em relação aos animais primo infectados.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Parasitos

Para realização deste estudo foram utilizadas quatro cepas de *T. gondii* isoladas de animais (D8, CH3 e N) e humano (EGS) (FERREIRA *et al.*, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2006). A cepa D8, não virulenta para camundongos, foi isolada de cão e classificada como cepa do tipo III para o loco *SAG2* e recombinante (I-III) quando submetida à análise de mais de um loci. 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. A cepa EGS foi isolada de líquido amniótico humano, é virulenta e foi classificada como tipo I para o loco *SAG2* e também recombinante (I-III). A cepa N foi isolada de coelho, é virulenta para camundongos e foi classificada como tipo I para o loco *SAG2* e I-III quando submetida à análise de outros loci (FERREIRA *et al.*, 2006). Com exceção da cepa N isolada em São Paulo, as outras cepas foram isoladas em Minas Gerais.

4.2 - Camundongos

Camundongos fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6, com 4 a 6 semanas de idade e pesando entre 18 e 20g no início do experimento, foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG (protocolo nº 038/05).

4.3 - Infecção Primária dos Camundongos

Para realização dos experimentos, camundongos “swiss” infectados aproximadamente três meses antes pela via oral com a cepa D8 foram sacrificados por deslocamento cervical e seu cérebro retirado. Ao cérebro macerado em tubo de hemólise, foi adicionado 1ml de PBS pH 7,2 estéril e os cistos foram contados em duplicata entre lâmina e lamínula. Após a contagem, a diluição do material foi realizada de forma a se obter uma concentração de 20 cistos por 100µl de solução. Foram inoculados 20 cistos por via oral da cepa D8 em camundongos BALB/c e C57BL/6 fêmeas, que foram mantidos por 45 e 180 dias até a realização do desafio com as cepas EGS, CH3 e N. Camundongos normais BALB/c e C57BL/6 fêmeas das mesmas ninhadas dos camundongos inoculados com a cepa D8 foram

mantidos pelo mesmo período (45 e 180 dias). Estes animais foram primo infectados, na mesma data do desafio, com as cepas EGS, CH3 e N como controle do experimento.

4.4 - Desafio de camundongos BALB/c com as cepas EGS, CH3 e N de *T. gondii* 45 dias após a infecção primária com a cepa D8

O desafio dos camundongos BALB/c foi realizado no 45º dia após a primo infecção. Camundongos BALB/c previamente infectados com a cepa D8 foram divididos em grupos de sete a dez animais. Somente foram utilizados para o desafio os camundongos que, pela técnica de ELISA, apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii* após a infecção primária com a cepa D8. O grupo A foi desafiado com 20 cistos via oral da cepa EGS; o grupo B com 20 cistos via oral da cepa CH3 e o grupo C desafiado com 1000 taquizoítos da cepa N por via intraperitoneal. O grupo D infectado somente com D8 foi mantido como controle do experimento. Os cistos das cepas EGS e CH3 foram obtidos conforme descrito para cepa D8. Para obtenção de taquizoítos da cepa N o peritônio de camundongos previamente infectados foi lavado e os taquizoítos foram contados e diluídos em PBS pH7,2 na concentração de 1000 taquizoítos/200µl.

No 45º dia também foram infectados 10 camundongos normais com cada uma das cepas utilizadas no desafio: 20 cistos via oral das cepas EGS (grupo E) e CH3 (grupo F) e 1000 taquizoítos via intraperitoneal da cepa N (grupo G) (FIG. 1). Estes camundongos eram provenientes das mesmas ninhadas dos animais submetidos ao desafio de reinfecção e também atuaram como controle do experimento. A mortalidade dos animais foi acompanhada por um período de trinta dias. Os animais sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical para contagem dos cistos cerebrais. Dos animais sobreviventes foi removida a parte anterior direita (quarta parte) do cérebro para ser submetido ao estudo histopatológico. O restante do cérebro foi macerado e foi realizada a contagem dos cistos. Vinte cistos de cada animal foram inoculados via oral em camundongos BALB/c normais para verificação da mortalidade (bioensaio). O restante do material foi inoculado em camundongos “swiss” normais pela via intraperitoneal (i. p.) para coleta de taquizoítos no peritônio e posterior extração de DNA.

4.5 - Desafio de camundongos BALB/c com as cepas EGS, CH3 e N de *T. gondii* 180 dias após a infecção primária com a cepa D8

Após 180 dias da primo infecção, camundongos BALB/c foram divididos em grupos de 9-10 animais. O grupo H foi desafiado com 20 cistos via oral da cepa EGS, o grupo I com 20 cistos via oral da cepa CH3 e o grupo J com 1000 taquizoítos da cepa N i. p. O grupo K infectado somente com D8 foi mantido como controle do experimento.

Três grupos de camundongos normais foram primo infectados com cada uma das cepas utilizadas na reinfeção: 20 cistos via oral das cepas EGS (grupo L) e CH3 (grupo M) e 1000 taquizoítos via intraperitoneal da cepa N (grupo N) (FIG. 1). A mortalidade dos animais foi acompanhada por um período de trinta dias. Para realização do estudo histopatológico a quarta parte do cérebro dos camundongos sobreviventes foi coletada. No cérebro restante foi realizada a contagem de cistos e foi realizado um inóculo de 20 cistos via oral em camundongos BALB/c normais para o bioensaio. Cistos cerebrais também foram inoculados i. p. em camundongos “swiss” normais para posterior coleta de taquizoítos e extração de DNA.

4.6 – Desafio de camundongos C57BL/6 com as cepas EGS, CH3 e N de *T. gondii* 45 dias após a infecção primária com a cepa D8

O desafio dos camundongos C57BL/6 após 45 dias da infecção primária (grupos de sete a dez animais) foi realizado conforme descrito nos itens anteriores para os camundongos BALB/c (FIG. 1). Os grupos receberam as seguintes identificações:

Grupo O - desafiado com 20 cistos via oral da cepa EGS;

Grupo P - desafiado com 20 cistos via oral da cepa CH3;

Grupo Q - desafiado com 1000 taquizoítos da cepa N por via intraperitoneal;

Grupo R - infectado somente com 20 cistos via oral da cepa D8.

Grupo S - infectado somente com a cepa EGS;

Grupo T - infectado somente com a cepa CH3;

Grupo U - infectado somente com a cepa N.

4.7 – Desafio de camundongos C57BL/6 com as cepas EGS, CH3 e N de *T. gondii* 180 dias após a infecção primária com a cepa D8

O desafio dos camundongos C57BL/6 após 180 dias da infecção primária (grupos de quatro a cinco animais) foi realizado conforme descrito nos itens anteriores para os camundongos BALB/c (FIG. 1). Os grupos receberam as seguintes identificações:

Grupo V - desafiado com 20 cistos via oral da cepa EGS;

Grupo X - desafiado com 20 cistos via oral da cepa CH3;

Grupo Y - desafiado com 1000 taquizoítos da cepa N por via intraperitoneal;

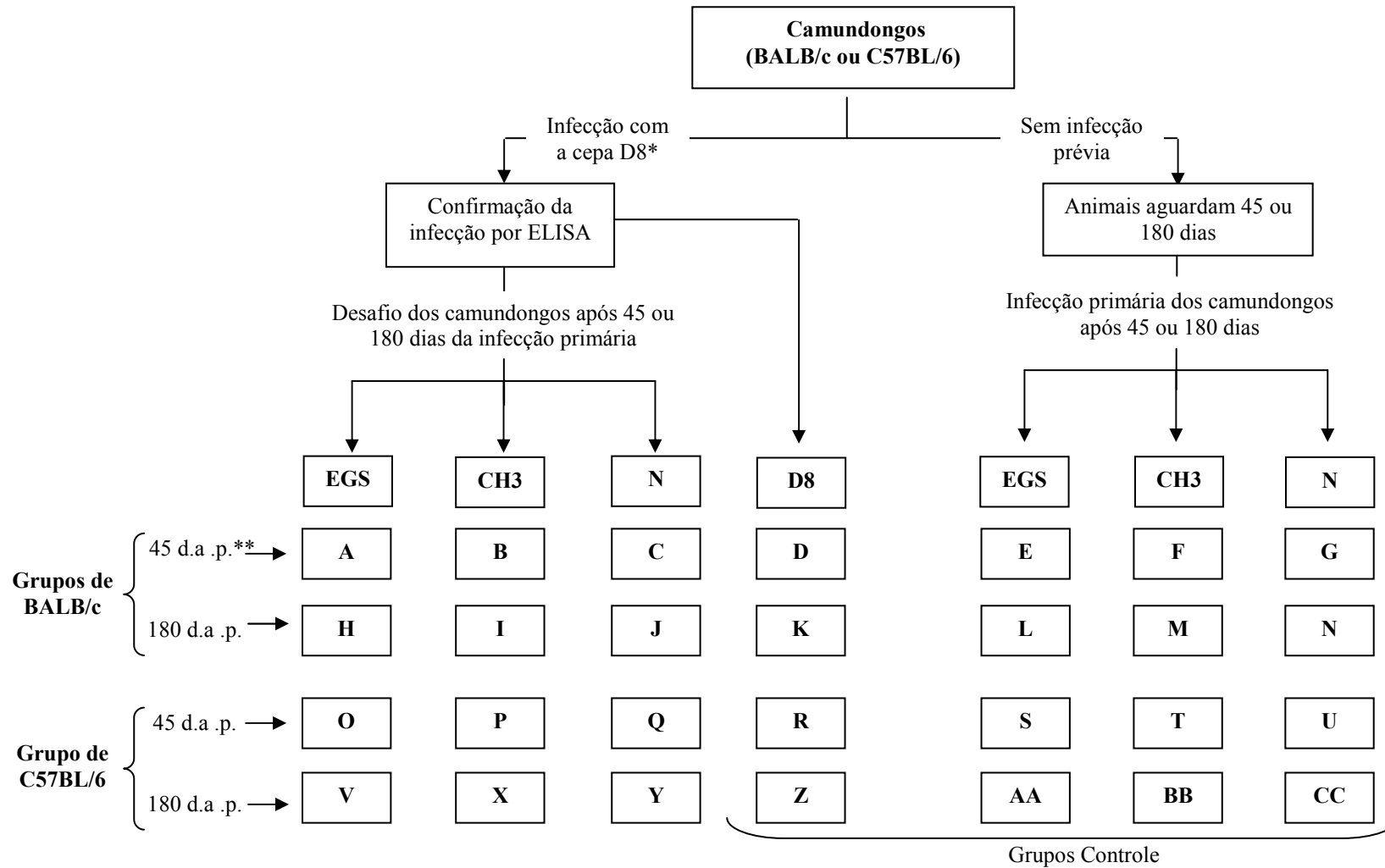
Grupo Z - infectado somente com 20 cistos via oral da cepa D8.

Grupo AA- infectado somente com a cepa EGS;

Grupo BB - infectado somente com a cepa CH3;

Grupo CC - infectado somente com a cepa N.

FIGURA 1 - Delineamento experimental da infecção e do desafio de camundongos BALB/c e C57BL/6 com as diferentes cepas de *T. gondii*.



4.8. - Bioensaio

O cérebro (3/4) dos camundongos BALB/c ou C57BL/6 sobreviventes aos trinta dias após o desafio foi macerado individualmente e homogeneizado em 750µl de PBS pH 7,2. Após a contagem do número de cistos cerebrais, foi realizada uma diluição de forma a se obter 20 cistos em 0,1ml. Para cada camundongo sobrevivente foi inoculado por via oral um novo camundongo BALB/c normal com 0,1ml da suspensão de cérebro contendo 20 cistos. A mortalidade destes animais foi acompanhada diariamente. A morte do animal foi considerada consequência da presença de pelo menos um cisto da cepa utilizada para o desafio. Camundongos sobreviventes foram sacrificados após 30 dias para pesquisa de anticorpos IgG (ELISA) e cistos cerebrais.

Para averiguar se a morte do animal pode realmente ser considerada consequência de pelo menos um cisto da cepa utilizada na reinfecção, foi delineado um experimento de infectividade e virulência com apenas um cisto cerebral de cada cepa estudada.

Um camundongo “swiss” previamente infectado com a cepa EGS foi sacrificado e o cérebro retirado para contagem de cistos. Deste material foi ajustado um inóculo padronizado de um cisto /0,1ml que foi administrado em oito camundongos BALB/c via oral. A mortalidade destes animais foi acompanhada por um período de 30 dias. O mesmo procedimento foi realizado para a cepa CH3.

A cepa N não é considerada cistogênica (FERREIRA *et al.*, 2006). Na tentativa de obter cistos cerebrais desta cepa, sete camundongos “swiss” foram inoculados com 10 taquizoítos via intraperitoneal e tratados após 24h com sulfadiazina (500mg/L) na água oferecida aos animais durante 20 dias. Somente um animal sobreviveu a 20 dias de infecção. Este animal foi sacrificado e o cérebro examinado exaustivamente. Nenhum cisto foi encontrado. Mesmo na ausência de cistos, cinco camundongos “swiss” foram inoculados com 0,1ml do homogenato bruto do cérebro, via oral. A mortalidade também foi avaliada até 30 dias após o inóculo.

4.9 - Tipagem genética de re-isolados de *T. gondii*

4.9.1 - Extração de DNA

Para extração de DNA o peritônio de camundongos “swiss” previamente infectados via i. p. com cistos de animais sobreviventes após o desafio foi lavado com PBS estéril sob

condições assépticas. A massa de taquizoítos obtida foi submetida à extração do DNA com fenol-clorofórmio conforme Sambrook e colaboradores (1989) com modificações conforme descrito a seguir. O DNA foi extraído de taquizoítos obtidos individualmente de cada camundongo e também de taquizoítos obtidos de camundongos “swiss” inoculados i.p. com um “pool” de alíquotas de cérebros de todos os animais sobreviventes de cada grupo.

A massa de taquizoítos obtida foi homogeneizada em 200µl de tampão de lise (TRIS HCl 0,1M pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0; SDS 0,2%; NaCl 1M). Em seguida foi adicionada proteinase K para uma concentração final de 0,1µg/µl. O homogenato obtido foi incubado em banho-maria a 37°C por 18 horas. Após este período foram adicionados 200µl de solução saturada de fenol pH 8,0 em cada tubo de microcentrífuga contendo o lisado de taquizoítos. Os tubos foram agitados por inversão durante 10 min e posteriormente o material foi centrifugado por 5 min, a 800xg, a 4°C. A fase aquosa obtida foi tratada novamente com solução saturada de fenol conforme descrito acima. Após o segundo tratamento com solução saturada de fenol foi adicionado igual volume de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) à fase aquosa. Novamente os tubos foram agitados por 10 min por inversão e levados a centrífuga por 5 min, a 800xg, a 4°C. Para precipitação do DNA a fase aquosa obtida após tratamento com clorofórmio álcool-isoamílico recebeu 2X o seu volume de etanol 70% gelado e o tubo foi agitado por inversão. Em seguida o material foi centrifugado por 10 min a 2000xg e o sedimento obtido secado ao ar. O sedimento foi então ressuspensionado em 30µl de “LOW TE” (10mM de Tris-HCl pH8,0; 1mM de EDTA pH8,0) e estocado a temperatura de 4°C, até o uso.

4.9.2 - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP)

Para verificar a presença de mais de uma cepa (diferentes genótipos) de *T. gondii* no cérebro de um mesmo animal foi realizada a análise pela PCR-RFLP em dois segmentos de DNA: *cS10-A6* e *L363* (Tabela 1), segundo Ferreira e colaboradores (2006).

As reações de amplificação foram processadas num volume final de 10µl contendo 5pmol de cada iniciador, 200µM de cada deoxiribonucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP, dCTP - Promega), 0,5 unidade da enzima “Go Taq Flexi” DNA polimerase (Promega), 2µl de tampão “Go Taq Flexi Green” 5X pH 8.5 (Promega), 1µl de tampão MgCl₂ 25mM (Promega) e aproximadamente 5ng de DNA molde. O primeiro passo da 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.

Os produtos da reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5%, não desnaturante, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Foram aplicadas alíquotas de 3µl do produto de amplificação em cada canaleta do gel. O gel foi submetido a 100 volts, por aproximadamente 45 minutos.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por coloração com nitrato de prata, de acordo com Santos e colaboradores (1993). O gel foi fixado à temperatura ambiente durante 10 minutos, em solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético. Em seguida o gel foi incubado em solução contendo 0,17% de nitrato de prata por 10 minutos. A revelação foi feita em solução contendo 3% de NaOH (p/v) e 0,3% de formaldeído 37% (v/v). Finalizada a fixação, as imagens dos géis foram capturadas usando um sistema de captura de imagem com máquina fotográfica digital.

Os produtos amplificados foram digeridos utilizando-se as endonucleases de restrição apropriadas (TAB. 1) segundo Ferreira e colaboradores (2006). As digestões com as endonucleases foram realizadas em um volume final de 10µl contendo 1µl do tampão correspondente, 3µl do produto da PCR (aproximadamente 5µg de DNA) e 2,5U (0,25µl) da enzima a 37°C conforme protocolo descrito pelo fabricante. O DNA dos produtos digeridos foi purificado pela extração com fenol/clorofórmio e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e corado com nitrato de prata. As cepas RH (tipo I), ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) foram utilizadas como padrão dos experimentos (FUX *et al.*, 2003).

TABELA 1 - 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) CCTAGTCCAAACTAGGGCTTGA	341	<i>RsaI</i>	SU <i>et al.</i> (2002)

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

4.10 – ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”)

Todos os camundongos foram sangrados 45 e 180 dias após a primo infecção com a cepa D8, antes da realização do desafio. Uma sorologia comparativa foi realizada utilizando o plasma de animais após 45 dias de infecção com a cepa D8 e de animais com 180 dias de infecção. Estes plasmas foram testados para IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA. Trinta dias após o desafio foi realizada outra coleta de plasma antes do sacrifício dos animais sobreviventes. Em todos estes animais foi realizada pesquisa de IgA, IgM e IgG (IgG total, IgG1 e IgG2a) pelo método de ELISA segundo Elsaid e colaboradores (2001).

Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital com pipeta Pasteur umedecida com heparina. Após centrifugação o plasma foi estocado a -20°C. Para preparação do antígeno, taquizoítos da cepa RH foram obtidos de camundongos “swiss” previamente infectados. O peritônio dos camundongos foi lavado três vezes com PBS pH 7,2 e o material lavado por centrifugação em PBS pH 7,2 por três vezes. Aliquotas de 10⁷ taquizoítos foram sonicadas, centrifugadas a 10.000rpm, dosadas pelo método de Lowry e estocadas a -20°C até o momento do uso, sendo denominadas “soluble tachyzoite antigen” (STAg).

Para a realização do ELISA, STAg foi diluído em tampão carbonato pH 9,6 a uma concentração de 5µg/ml e cerca de 100 µl (0,5µg) deste antígeno foi colocado em cada orifício da placa por 18hs a 4°C. Após este período a placa foi lavada por quatro vezes com solução de lavagem (0,9% de NaCl em PBS-T 0,05%). Em cada poço foi adicionado 100µl de plasma diluído em PBS-Tween-20 0,05% (PBS-T) na concentração de 1:100 (IgG) e 1:50 (IgG1, IgG2a, IgM and IgA). Após 45 min a 37°C a placa foi lavada e foi adicionado anti-IgG (1: 10000), anti-IgG1 (1:8000), anti-IgG2a (1:10000), anti-IgM (1:1000) ou anti-IgA

(1:1000) de camundongo (Sigma), marcado com peroxidase. A placa foi novamente incubada por 45 min a 37°C. Após este período a placa foi lavada e foi adicionado o substrato (orto-fenilenediamino + H₂O₂ em ácido cítrico, pH 5,0). A reação foi interrompida com 30µl de H₂SO₄ 4N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas da BIO RAD modelo 3550 e filtro de 490nm.

Os camundongos sobreviventes do bioensaio também foram sangrados no 30º dia, imediatamente antes do sacrifício. O ELISA foi realizado somente para confirmação da presença de anticorpos anti- *T. gondii* através da dosagem de IgG total.

4.11 - “Western Blotting”

Os plasmas obtidos dos camundongos em cada experimento de reinfecção foram submetidos à análise por “Western Blotting” (WB). Para preparação do antígeno, 10⁶ taquizoítos da cepa RH obtidos como descrito para a ELISA foram estocados a -20°C até o momento do uso.

Cerca de 1x10⁶ taquizoítos foram suspensos em 200µl de tampão de amostra (0,23g de dodecil sulfato de sódio (SDS); 1,25ml de Tris-HCl 0,5 M pH6,8; 2,0ml de glicerol; 0,5ml de mercapto-etanol, 0,137g de azul de bromofenol e 10ml água deionizada q.s.p.) e o material foi centrifugado a 30.000g por 30 min a 4°C. Após este período, foi adicionado 200µl de tampão de amostra ao sobrenadante e o material foi aquecido a 100°C por três minutos. As amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida a 10% no sistema “Mini Protean II” (BIO RAD) juntamente com os pesos moleculares: fosforilase B (97kDa), albumina bovina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (29kDa), tripsinogênio (24kDa) (SIGMA).

A eletrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose de 0,45µm de porosidade foi realizada conforme previamente descrito por Vitor e colaboradores (1999). O gel foi colocado em contato com a membrana entre folhas de papel de filtro e espuma formando um “sanduíche”. Este conjunto foi colocado no aparelho de eletrotransferência, Minitrans-Blot da BIO-RAD contendo o tampão de transferência (metanol a 20% em Tris 25mM e glicina 192mM, pH 8,0). A transferência foi realizada à temperatura ambiente por 18 horas e sob voltagem constante de 30V e 40mA. Uma hora antes do término da transferência o limite da amperagem foi alterado para 90mA. Após a transferência as membranas foram bloqueadas com leite desnatado Molico 10% em PBS-T por duas horas e posteriormente estocadas a -20°C até o momento do uso.

As membranas foram cortadas em fitas de 0,3 mm e incubadas por uma hora com os plasmas dos camundongos (coletas do dia 0 e 30 após o desafio), diluídos 1:200 em caseína a 10% em PBS-T. Após este período as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T e em seguida incubadas por uma hora em conjugado anti-IgG (SIGMA) diluído 1:1000 em PBS pH 7,2. Após duas lavagens com PBS-T e uma lavagem com PBS as proteínas foram reveladas utilizando-se o 4-cloro-1-naftol, 3,3 diaminobenzidina e 10µl de H₂O₂ em PBS pH 7,2. Após a visualização das bandas a reação foi interrompida pela lavagem da membrana em água destilada. O peso molecular dos principais antígenos reconhecidos foi calculado por comparação com os padrões de peso molecular.

4.12 – Dosagem de IFN- γ e IL-10 no sobrenadante de esplenócitos de camundongos primo infectados com a cepa D8

A resposta imune celular em camundongos BALB/c e C57BL/6 no momento do desafio (45 e 180 dias após a primo infecção) foi avaliada por meio de dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de células do baço.

4.12.1 - Cultura de células do baço de camundongos infectados com a cepa D8 do *T. gondii*

Grupos de oito camundongos BALB/c ou C57BL/6 foram infectados com a cepa D8, enquanto grupos correspondentes de animais não infectados, de cada linhagem, foram mantidos como controle negativo. Para avaliação da produção de citocinas em diferentes tempos pós-infecção, animais de cada grupo foram sacrificados 45 ou 180 dias após a primo infecção. Os baços destes animais foram macerados individualmente em 5mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 40µg/mL de gentamicina (meio de cultivo completo). As suspensões de esplenócitos totais foram centrifugadas a 180xg por 10 minutos a 4° C. Após a centrifugação, os esplenócitos totais foram ressuspensos em 5mL de um tampão de lise de eritrócitos (composto por 0,15M NH₄Cl, 1M KHCO₃ e 0,1M Na₂.EDTA) e incubados em banho de gelo por 5 minutos. A solução de lise foi neutralizada pela adição de 5mL de meio de cultivo completo e as células foram novamente centrifugadas a 180xg por 5 minutos a 4° C. Seguiram-se três lavagens adicionais dos esplenócitos totais em meio de cultivo completo a 180xg, por 5 minutos a 4° C. Os esplenócitos foram então ressuspensos em meio de cultivo completo e plaqueados a 10⁷ células/poço em placas de 24 poços. Os estímulos para ativação das células T “in vitro” consistiram de antígeno solúvel de taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH (STAg 10µg/mL) e concanavalina A (10µg/mL)

adicionados aos poços com células para completar volume final de 1mL de cultivo por poço. Os esplenócitos foram incubados por 72 horas a 37° C e 5% de CO₂. Os sobrenadantes de cultivo obtidos após esse período de incubação foram armazenados a -70° C, até o momento da dosagem das citocinas secretadas. Os experimentos foram repetidos duas vezes, de maneira independente.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.12.2 - Dosagem de Citocinas

Para dosagem de IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes de cultivos de esplenócitos foram utilizados “kits” comerciais BD OptEIA[®] (BD Biosciences) que permitem a detecção de citocinas por meio de ELISA. O protocolo foi realizado de acordo com instruções do fabricante. Placas de 96 poços (Maxisorp[®], Nunc) foram sensibilizadas com 100 μ L/poço do anticorpo monoclonal anti-citocina diluído a 1:250 em tampão carbonato pH=9,5 (anti-IFN- γ) ou tampão fosfato pH=6,5 (anti-IL-10) durante 18 horas a 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS-T composto de PBS pH=7,0 acrescido de 0,05% de polisorbato (Tween20[®], Acros). As placas foram bloqueadas com 200 μ L/poço de um tampão composto de PSB acrescido de 10% de soro fetal bovino (PBS-10), durante 90 minutos a temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens das placas com PBS-T e três com PBS puro. Sobrenadantes de cultivo de células de baço, obtidos conforme descrito no item anterior foram adicionados as placas (100 μ L/poço, em duplicatas) e incubados por 18 horas a 4°C. Os sobrenadantes dos cultivos de esplenócitos de camundongos BALB/c foram diluídos 1:5 e 1:50 para dosagem de IL-10 e INF- γ , respectivamente. Os sobrenadantes obtidos nos cultivos de esplenócitos de camundongos C57BL/6 não foram diluídos nesse ensaio. Após a incubação com os sobrenadantes, seguiu-se nova rodada de três lavagens das placas com PBS-T e PBS puro. A reação de detecção das citocinas capturadas foi feita pela adição de 100 μ L/poço de uma solução contendo o anticorpo anti-citocina conjugado com biotina e peroxidase conjugada a streptoavidina, ambos na concentração de 1:250 em PBS-10. As placas foram, então, incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente. Seguiram-se seis lavagens com PBS-T e três com PBS puro. As reações foram reveladas pela adição de 100 μ L/poço da solução de substrato composta por 10ml de tampão citrato-fosfato pH=5,0 (0,05M Na₃C₆H₅O₇.2H₂O; 0,05M NaH₂PO₄.H₂O), 30 μ L de H₂O₂ 30V e 10mg/mL de 3',3',5',5'tetrametilbenzidina (TMB, Sigma). Após incubação por 30 minutos, no escuro e a

temperatura ambiente, as reações foram interrompidas com 40 µl/poço de H₂SO₄ 4N. As absorvâncias foram medidas a 450nm em espectrofotometro (Spectramax Plus[®], Molecular Devices).

4.13 – Avaliação Histopatológica

Para realização do exame histopatológico em cortes de cérebro corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), a quarta parte de cada cérebro dos camundongos sobreviventes 30 dias após o desafio foram coletados. Após o sacrificio dos camundongos foi coletada a região anterior da metade direita do cérebro dos animais que foi fixada em formol a 10% em PBS pH 7,2.

Para realização dos cortes histológicos os fragmentos cerebrais foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 99,5%), diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em parafina e submetidos à microtomia para a obtenção de cortes histológicos com 3 a 5µm de espessura. Os cortes teciduais foram desparafinados durante 30 minutos em estufa a 40-50°C, seguido por dois banhos em xilol de 15 minutos cada e reidratados em concentrações decrescentes de álcool (99,5, 90, 80 e 70%) sendo então imersos em água. A coloração foi realizada com Hematoxilina de Meyer's durante 1min à temperatura ambiente e lavada por 10 min em água corrente, posteriormente o corte foi deixado por 1 min em eosina. O material foi desidratado com banhos de alcoóis em concentração crescente e a lâmina montada com Bálsamo do Canadá. A quantificação dos nódulos gliais e dos infiltrados inflamatórios perivasculares foi realizada em 20 imagens aleatórias, com objetiva de 40X, obtidas por uma microcâmera Leica DM5000B totalizando uma área percorrida igual a 1,5 x 10⁶ µm² do cérebro.

4.14 - Análise Estatística

A diferença no número médio de cistos no cérebro dos camundongos e a média das absorvâncias obtidas pelo ELISA nos diferentes grupos foram avaliadas por Análise de Variância (“One- way ANOVA”) com o teste Kruskal-Wallis. A intensidade da reação inflamatória no cérebro e o nível de citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos nos diferentes grupos de camundongos foram determinados pelo teste T student. Para todos os testes estatísticos mencionados acima a diferença foi considerada significativa quando $p <$

0,05. Foi utilizado o Programa “GraphPad Prism” versão 4.00 para Windows, Software GraphPad, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com.

5 – RESULTADOS

5.1 – Avaliação da mortalidade e do bioensaio de camundongos BALB/c desafiados aos 45 e 180 dias após a primo infecção com a cepa D8

5.1.1 - Desafio 45 dias após a infecção primária

Os camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 (grupo D) apresentaram 100% de sobrevivência durante os trinta dias de acompanhamento. Os animais desafiados com a cepa EGS (grupo A), CH3 (grupo B) e N (grupo C) também apresentaram 100% de sobrevivência. Os camundongos primo infectados com EGS (grupo E), CH3 (grupo F) e N (grupo G) apresentaram 100% de mortalidade (GRAF. 1 e TAB. 2). O número de cistos no cérebro dos animais desafiados com as cepas EGS (grupo A), CH3 (grupo B) e N (grupo C) não foi significativamente diferente dos animais infectados apenas com D8 (grupo D) (GRAF. 3 e TAB. 2).

No bioensaio, camundongos BALB/c infectados com 20 cistos provenientes do cérebro de animais primo infectados com D8 (grupo D) e desafiados com CH3 (grupo B) e N (grupo C) apresentaram 100% de sobrevivência. Os animais infectados com cistos provenientes dos cérebros de camundongos desafiados com EGS (grupo A) apresentaram 75% de sobrevivência. Todos os camundongos sobreviventes do bioensaio apresentaram cistos no cérebro e ELISA-IgG positiva para *T. gondii*, com exceção de um animal do grupo D (TAB. 2).

Em um experimento da validação da sensibilidade do bioensaio, de oito camundongos BALB/c inoculados pela via oral com um único cisto da cepa EGS, cinco (62,5%) morreram. Entre os três animais sobreviventes não foram encontrados cistos teciduais ou anticorpos para *T. gondii*. Em oito camundongos inoculados com um cisto da cepa CH3, quatro (50%) morreram. Entre os sobreviventes dois camundongos apresentaram anticorpos e cistos teciduais. Dois camundongos não se infectaram. Para a cepa N, o inóculo via oral de 0,1ml de homogenato de cérebro de animal com 20 dias de infecção, sem a detecção de cistos ao microscópio ótico, matou os cinco (100%) camundongos “swiss” estudados.

5.1.2 - Desafio 180 dias após a infecção primária

Os camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 apresentaram 100% de sobrevivência. Os animais primo infectados com D8 e desafiados aos 180 dias com a cepa EGS (grupo H) e CH3 (grupo I) apresentaram 89,9 e 90% de sobrevivência, respectivamente, durante os trinta dias de acompanhamento da mortalidade. Já animais desafiados com a cepa N (grupo J) apresentaram 40% de sobrevivência. Os camundongos primo infectados com EGS, CH3 e N apresentaram 100% de mortalidade (GRAF. 2 e TAB. 3). O número de cistos no cérebro dos camundongos desafiados 180 dias após a primo infecção com a cepa EGS (grupo H) mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao número de cistos no cérebro dos animais infectados apenas com a cepa D8 (grupo K) (GRAF. 4 e TAB.3).

Na realização do bioensaio, os camundongos BALB/c infectados com cistos provenientes do cérebro de camundongos infectados com D8 (grupo K) e do grupo dos animais desafiados com CH3 (grupo I) apresentaram 100% de sobrevivência. Os animais infectados com cistos provenientes dos cérebros de camundongos do grupo H (desafiados com EGS) e do grupo J (desafiados com N) apresentaram 0% e 75% de sobrevivência, respectivamente. Todos os camundongos sobreviventes da bioprova apresentaram cistos no cérebro e ELISA-IgG positiva para *T. gondii*, com exceção de um animal infectado com D8 (grupo K) que apresentou sorologia negativa (TAB. 3).

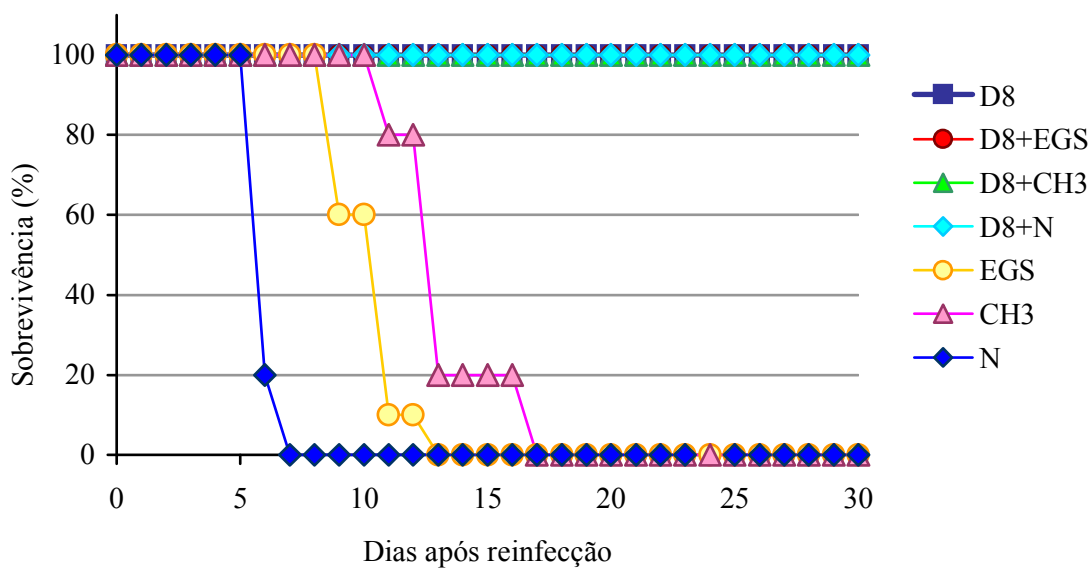


GRÁFICO 1 - Sobrevivência de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N após 45 dias de infecção. Controles primo infectados com as cepas D8, EGS, CH3 e N.

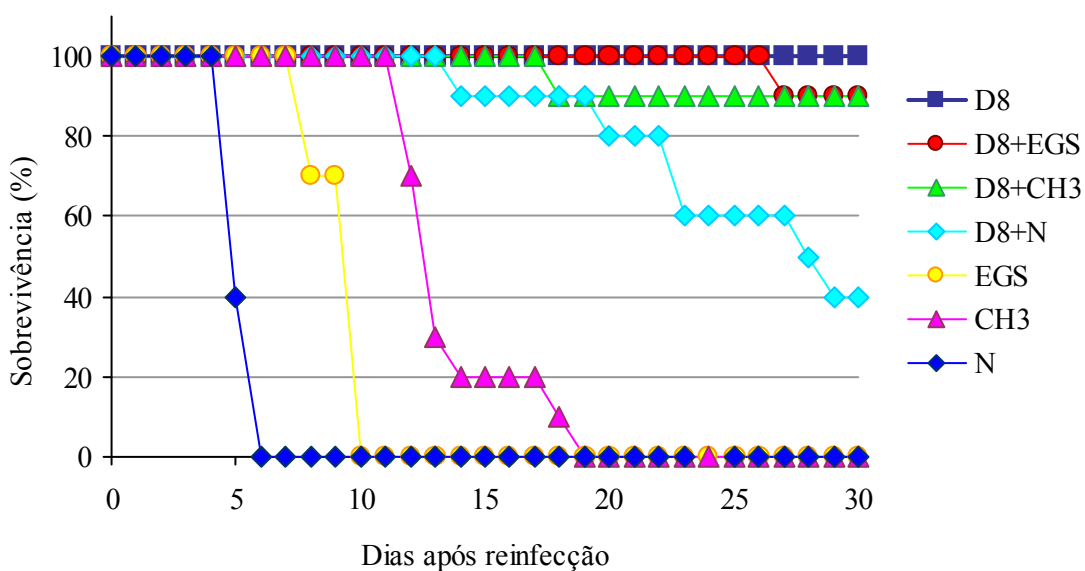


GRÁFICO 2 - Sobrevivência de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N após 180 dias de infecção. Controles primo infectados com as cepas D8, EGS, CH3 e N.

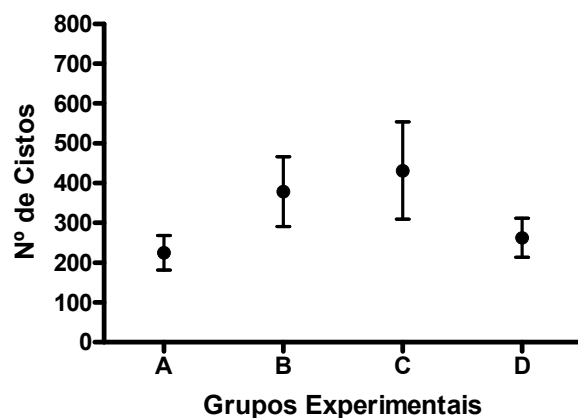


GRÁFICO 3 - Número médio de cistos no cérebro de camundongos BALB/c primo infectados com D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N. Grupos experimentais: animais primo infectados com a cepa D8 (grupo D) e animais primo infectados com D8 e desafiados aos 45 dias com as cepas EGS (grupo A), CH3 (grupo B) e N (grupo C).

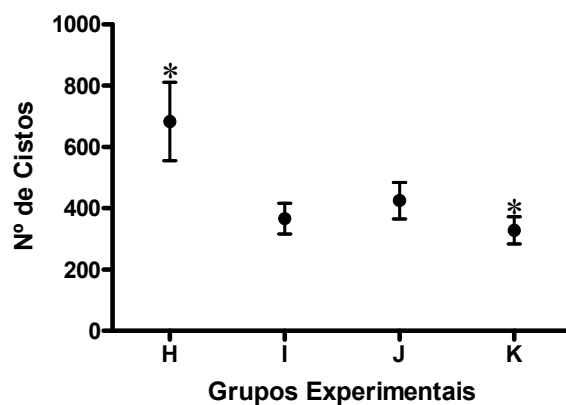


GRÁFICO 4 - Número médio de cistos no cérebro de camundongos BALB/c primo infectados com D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N. Grupos experimentais: animais primo infectados com a cepa D8 (grupo K) e animais primo infectados com D8 e desafiados aos 180 dias com as cepas EGS (grupo H), CH3 (grupo I) e N (grupo J). * $p < 0.05$.

TABELA 2 - Percentagem de sobrevivência e número de cistos cerebrais em camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 dias com as cepas EGS, CH3 e N. O bioensaio foi avaliado por sobrevivência, presença de cistos cerebrais e anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfeção.

		Desafio 45 dias após a primo infecção				
		Reinfecção		Bioensaio		
Cepas	Grupos	Sobrevivência ^a	Número de Cistos	Sobrevivência ^a	Cistos ^b	Anticorpos ^c
D8+EGS	A	100% (8/8)	225±122.5	75% (6/8)	6/6	6/6
D8+CH3	B	100% (7/7)	378.6±232.5	100% (7/7)	7/7	7/7
D8+N	C	100% (8/8)	431.3±346.3	100% (8/8)	8/8	8/8
D8	D	100% (8/8)	262.5±138.2	100% (8/8)	7/8	7/8
EGS	E	0% (0/10)	-	-	-	-
CH3	F	0% (0/10)	-	-	-	-
N	G	0% (0/10)	-	-	-	-

a - camundongos vivos/ camundongos inoculados (30 dias após infecção).

b - camundongos com presença de cistos cerebrais/ total de camundongos.

c - camundongos com anticorpos IgG (ELISA) anti-*T. gondii* / total de camundongos.

Cada experimento foi repetido e os resultados confirmados.

TABELA 3 - Percentagem de sobrevivência e número de cistos cerebrais em camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N. O bioensaio foi avaliado por sobrevivência, presença de cistos cerebrais e anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfeção.

Desafio 180 dias após primo infecção						
Cepas	Grupo	Reinfecção		Bioensaio		
		Sobrevivência ^a	Número de Cistos	Sobrevivência ^a	Cistos ^b	Anticorpos ^c
D8+EGS	H	88,9% (8/9)	683.3±383.2*	0% (0/8)	-	-
D8+CH3	I	90% (9/10)	366.7±150	100% (9/9)	9/9	9/9
D8+N	J	40% (4/10)	425±119	75% (3/4)	3/3	3/3
D8	K	100% (10/10)	327.8±132.5*	100% (10/10)	10/10	9/10
EGS	L	0% (0/10)	-	-	-	-
CH3	M	0% (0/10)	-	-	-	-
N	N	0% (0/10)	-	-	-	-

a - camundongos vivos/ camundongos inoculados (30 dias após infecção).

b - camundongos com presença de cistos cerebrais/ total de camundongos.

c - camundongos com anticorpos IgG (ELISA) anti-*T. gondii* / total de camundongos.

Cada experimento foi repetido e os resultados confirmados.

* p<0,05

5.2 - Tipagem genética de re-isolados de *T. gondii* de camundongos BALB/c desafiados 45 e 180 dias após primo infecção

5.2.1 – Camundongos desafiados aos 45 dias

Para a confirmação da ocorrência de reinfeção em camundongos BALB/c, 45 dias após a primo infecção, foram utilizados dois marcadores moleculares (*cS10-A6* e *L363*) capazes de distinguir o material genético de duas cepas diferentes após a clivagem com endonucleases de restrição específicas.

A PCR-RFLP realizada nas amostras de DNA utilizando-se o marcador *cS10-A6* e a endonuclease de restrição *RsaI* permitiu a distinção entre a cepa D8 e as cepas EGS, CH3 e N (TAB. 4 e FIG. 2). Através deste marcador, a análise das amostras de *T. gondii* obtidas do “pool” de cérebros mostrou a coexistência das cepas D8 e EGS e das cepas D8 e N em camundongos desafiados aos 45 dias da primo infecção. Não foi observada a coexistência das cepas D8 e CH3 em camundongos BALB/c, pois através deste marcador foi possível verificar que, no material genético proveniente do “pool” de cérebros dos animais infectados com D8 e desafiados com CH3 (grupo B) só estava presente a banda característica da cepa D8 (FIG. 2A). No material genético proveniente do “pool” de cérebros de animais infectados com D8 e desafiados com EGS (grupo A) ou com N (grupo C) foi observada a presença da banda característica da cepa D8 e da cepa EGS e das cepas D8 e N, respectivamente. Estes resultados confirmam a coexistência de duas cepas no cérebro de um mesmo animal. A análise individual do DNA de *T. gondii* obtido dos camundongos desafiados revelou que 75% dos animais se reinfectaram com a cepa EGS, 12,5% se reinfectaram com a cepa N e nenhum animal se reinfectou com a cepa CH3 (TAB. 4, FIG. 4A).

Foi utilizado também o marcador *L363* e a endonuclease de restrição *HpyCH4IV* que permite a distinção entre a cepa D8 e a cepa N. Desta forma, apenas as amostras obtidas de animais desafiados com a cepa N foram avaliadas para este loco. A análise com este marcador confirmou os resultados obtidos com o marcador *cS10-A6* (FIG. 2B).

5.2.2 – Camundongos desafiados aos 180 dias

Através da PCR-RFLP utilizando o marcador *cS10-A6* e a endonuclease de restrição *RsaI* foi possível confirmar a coexistência das cepas D8 e EGS (grupo H) e D8 e CH3 (grupo

I) no “pool” de cérebros de camundongos BALB/c desafiados aos 180 dias. O DNA proveniente do “pool” de cérebros obtido dos animais desafiados com a cepa N (grupo J) somente apresentou a banda característica da cepa usada na primo infecção (D8) (FIG. 3A). A análise individual do DNA de *T. gondii* mostrou que 100% dos animais sobreviventes apresentavam a coexistência das cepas D8 e EGS (grupo H), 66,7% tinham as cepas D8 e CH3 (grupo I), e nenhum animal sobrevivente apresentava a coexistência das cepas D8 e N (grupo J) (TAB. 4, FIG 4B)

O DNA amplificado com o marcador *L363* e digerido com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV* confirmou os resultados obtidos com o marcador *cS10-A6*. No DNA proveniente do cérebro de animais sobreviventes desafiados com a cepa N (grupo J) não foi observada a coexistência das cepas D8 e N (FIG. 3B), apesar de um dos camundongos do bioensaio ter morrido após o desafio.

TABELA 4 - Genotipagem dos loci *cS10-A6* e *L363* de cepas de *T. gondii* por PCR-RFLP. DNA foi extraído de taquizoítos obtidos do peritônio de camundongos “swiss” inoculados por via intraperitoneal 5-7 dias antes com cistos cerebrais de camundongos BALB/C sobreviventes primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias ou 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N.

Fonte de DNA	Desafio após 45 dias		Desafio após 180 dias	
	Locus		Locus	
	<i>cS10-A6</i>	<i>L363</i>	<i>cS10-A6</i>	<i>L363</i>
D8+EGS “pool”	Sim	NC ^b	Sim	NC
D8+CH3 “pool”	Não	NC ^b	Sim	NC
D8+N “pool”	Sim	Sim	Não	Não
D8+EGS individual	6/8 ^a (75%)	NR ^c	8/8 (100%)	NR
D8+CH3 individual	0/7 (0%)	NR ^c	6/9 (66,7%)	NR
D8+N individual	1/8 (12,5%)	1/8 (12,5%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)

a- n° de camundongos coinfectados com as duas cepas/ total de camundongos desafiados

b- NC: não conclusivo (*L363* só permite distinção entre as cepas D8 e N)

c- NR: não realizado

Sim – PCR positiva para ambas as cepas

Não – PCR positiva somente para a cepa D8 (primo infecção)

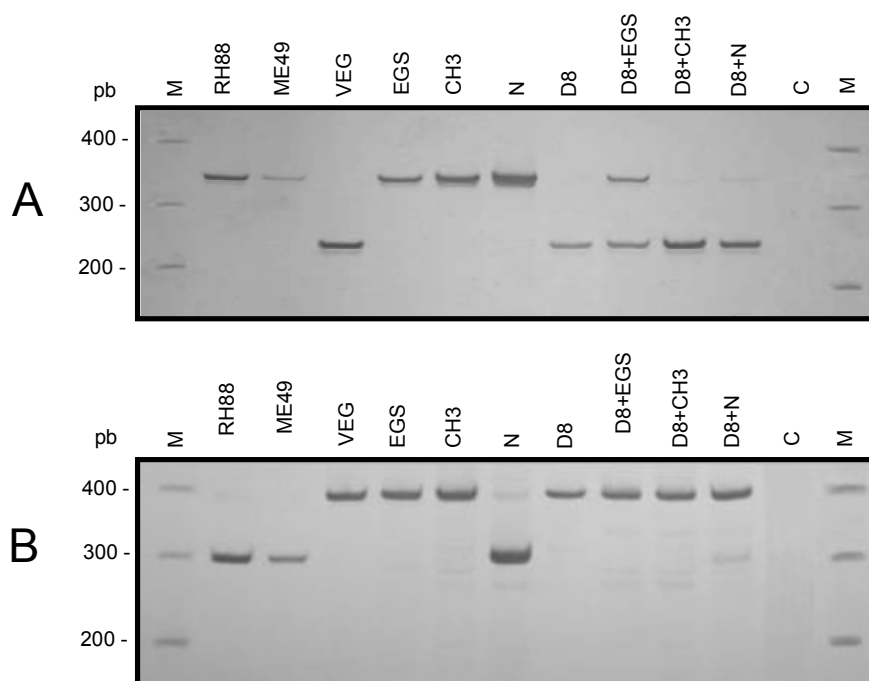


FIGURA 2 – PCR-RFLP em dois loci de *T. gondii*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfecção em DNA extraído de “pool” de cérebros de camundongos BALB/c 45 dias após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA. **A:** PCR-RFLP do loco *cS10-A6* com a endonuclease de restrição *RsaI*. **B:** PCR-RFLP do loco *L363* com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*.

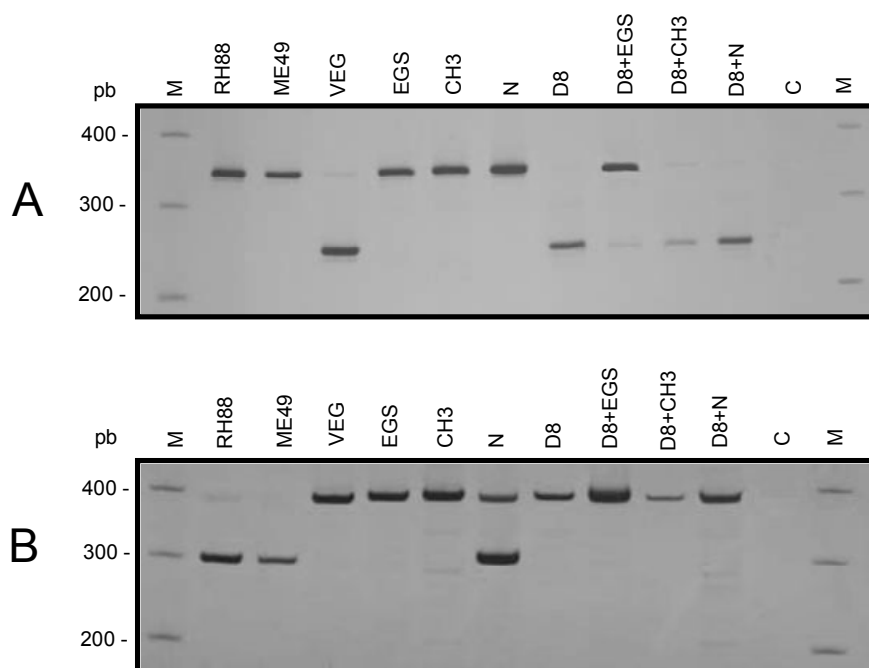


FIGURA 3 – PCR-RFLP em dois loci de *T. gondii*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfeção em DNA extraído de “pool” de cérebros de camundongos BALB/c 180 dias após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA. **A:** PCR-RFLP do loco *cS10-A6* com a endonuclease de restrição *RsaI*. **B:** PCR-RFLP do loco *L363* com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*.

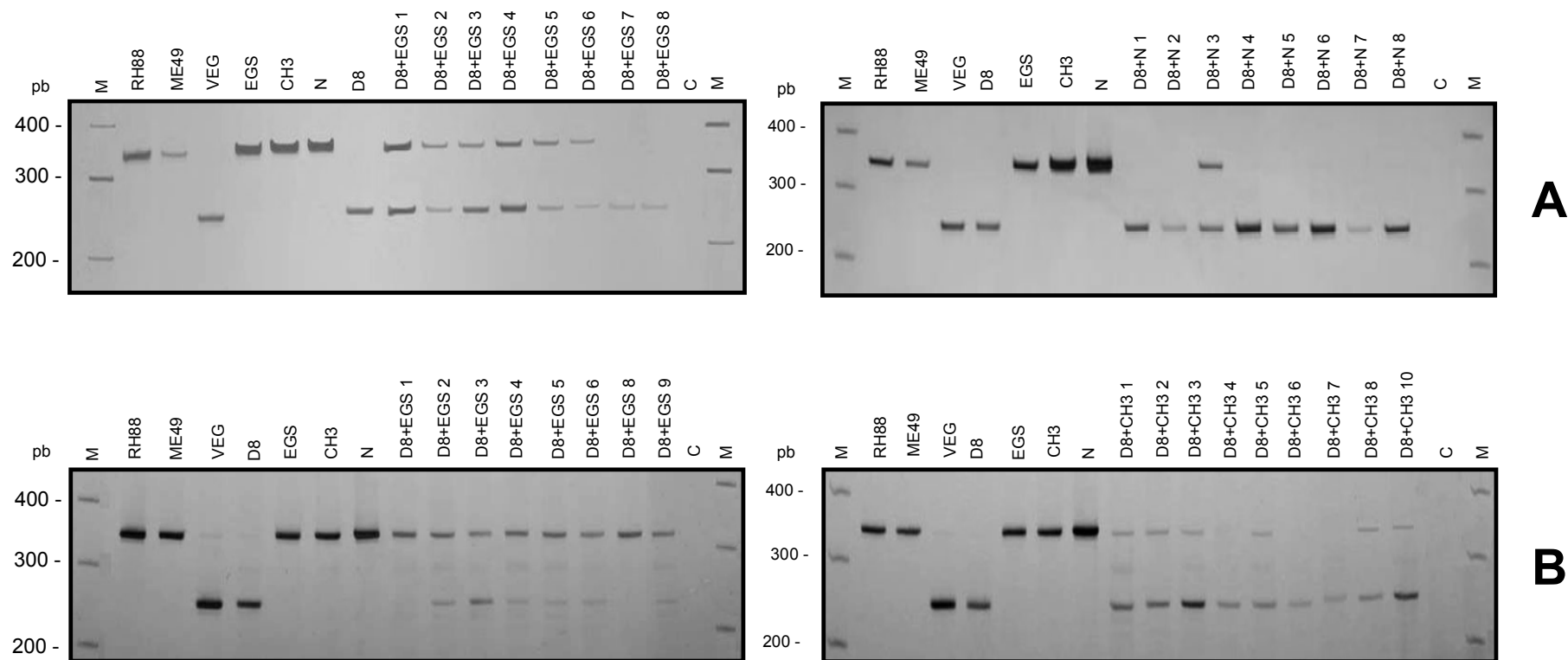


FIGURA 4 – PCR-RFLP do loco *cS10-A6* de *T. gondii* com a endonuclease de restrição *RsaI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfeção em DNA extraído individualmente de cérebros de camundongos BALB/c 45 (A) e 180 dias (B) após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb).

5.3 - Anticorpos anti-*T. gondii* em camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 e 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N

5.3.1 - IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos desafiados aos 45 dias após a primo infecção com a cepa D8

A reatividade de IgG e IgG1 contra os antígenos de *T. gondii* dosada no plasma dos animais infectados com D8 (grupo D) ou desafiados aos 45 dias com EGS (grupo A), CH3 (grupo B) e N (grupo C) apresentou discreto aumento na absorbância no trigésimo dia em comparação ao dia 0. O aumento da absorbância observado no trigésimo dia apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os grupos testados com exceção da reatividade de IgG dos animais desafiados com CH3 (grupo B) e da reatividade de IgG1 dos animais desafiados com N (grupo C) (GRAF. 5 A e B). Entretanto, o grupo infectado apenas com a cepa D8 (grupo D) apresentou tendência de aumento semelhante. A reatividade de IgG2a contra os antígenos de *T. gondii* nos animais infectados com D8 (grupo D) e desafiados com EGS (grupo A), CH3 (grupo B) e N (grupo C) não apresentou alteração de absorbância no trigésimo dia em comparação ao dia 0 ($p > 0,05$) (GRAF. 5C).

5.3.2 - IgM e IgA em camundongos desafiados aos 45 dias após primo infecção com a cepa D8

A reatividade de IgM contra os antígenos de *T. gondii* também foi testada no plasma de animais infectados somente com D8 (grupo D) ou desafiados aos 45 dias com as cepas EGS (grupo A), CH3 (grupo B) e N (grupo C). Não foi evidenciada, para esta imunoglobulina, qualquer alteração na absorbância em plasmas coletados antes (dia 0) e após o desafio (trigésimo dia) ($p > 0,05$) (GRAF. 6A).

A reatividade de IgA contra os antígenos de *T. gondii* apresentou uma tendência de aumento de absorbância no dia 30 em relação ao dia 0 para todos os grupos de animais desafiados (grupos A, B e C) ($p < 0,05$). Este padrão não foi observado para o grupo infectado somente com D8 (grupo D) (GRAF. 6B).

5.3.3 - IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos BALB/c desafiados aos 180 dias após primo infecção com a cepa D8

A reatividade de IgG, IgG1 e IgG2a contra os antígenos de *T. gondii* dosadas no plasma dos animais infectados com D8 (grupo K) e desafiados aos 180 dias com EGS (grupo H), CH3 (grupo I) e N (grupo J) não apresentou qualquer alteração na absorvância no trigésimo dia em comparação ao dia 0 ($p>0,05$) (GRAF. 7 A, B e C).

5.3.4 - IgM e IgA em camundongos BALB/c desafiados aos 180 dias após primo infecção com a cepa D8

A reatividade de anticorpos IgM para *T. gondii* em animais infectados somente com D8 (grupo K) ou desafiados aos 180 dias com as cepas EGS (grupo H), CH3 (grupo I) e N (grupo J) não evidenciou qualquer alteração na absorvância em plasmas coletados antes (dia 0) e após o desafio (trigésimo dia) ($p>0,05$) (GRAF. 8A).

A reatividade de IgA contra os antígenos de *T. gondii* apresentou uma tendência de aumento de absorvância no dia 30 em relação ao dia 0 para todos os grupos de animais desafiados (grupos H, I e J) ($p<0,05$). Este padrão não foi observado para o grupo infectado somente com D8 (grupo D) (GRAF. 8B).

5.3.5 – Anticorpos IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA em camundongos BALB/c aos 45 e 180 dias de infecção apenas com a cepa D8

A reatividade de IgG, IgG2a e IgM contra os antígenos de *T. gondii* nos plasmas de animais com 45 dias de infecção com a cepa D8 não apresentou qualquer alteração na absorvância quando comparados aos plasmas dos animais com 180 dias de infecção com esta cepa ($p>0,05$). A reatividade de IgG1 e IgA contra os antígenos de *T. gondii* apresentou uma tendência de aumento de absorvância nos plasmas dos animais com 180 dias de infecção com a cepa D8 comparativamente aos plasmas dos animais com 45 dias de infecção ($p<0,05$). (GRAF. 9).

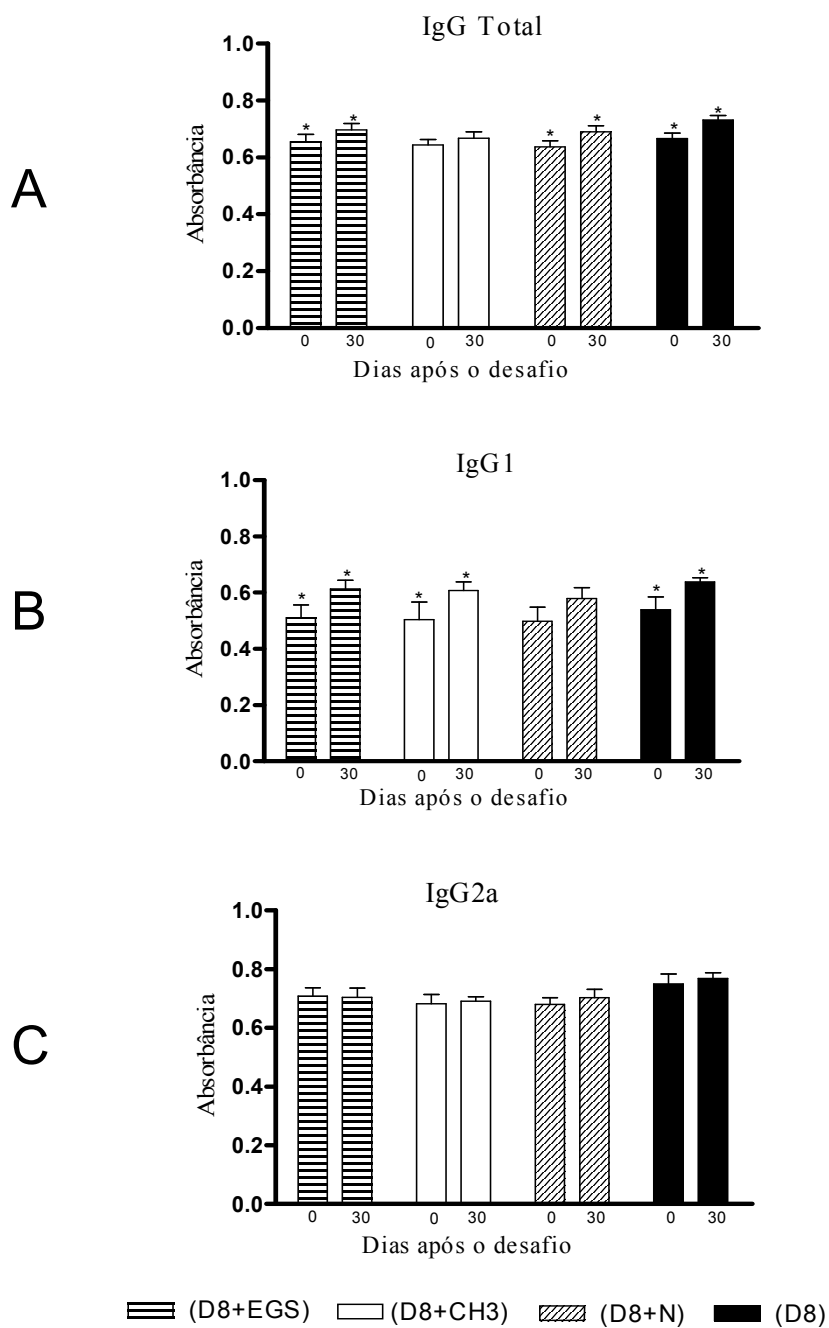


GRÁFICO 5 - Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepa EGS, CH3 e N. A - IgG total, B - IgG1 e C - IgG2a. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio. * - $p < 0,05$.

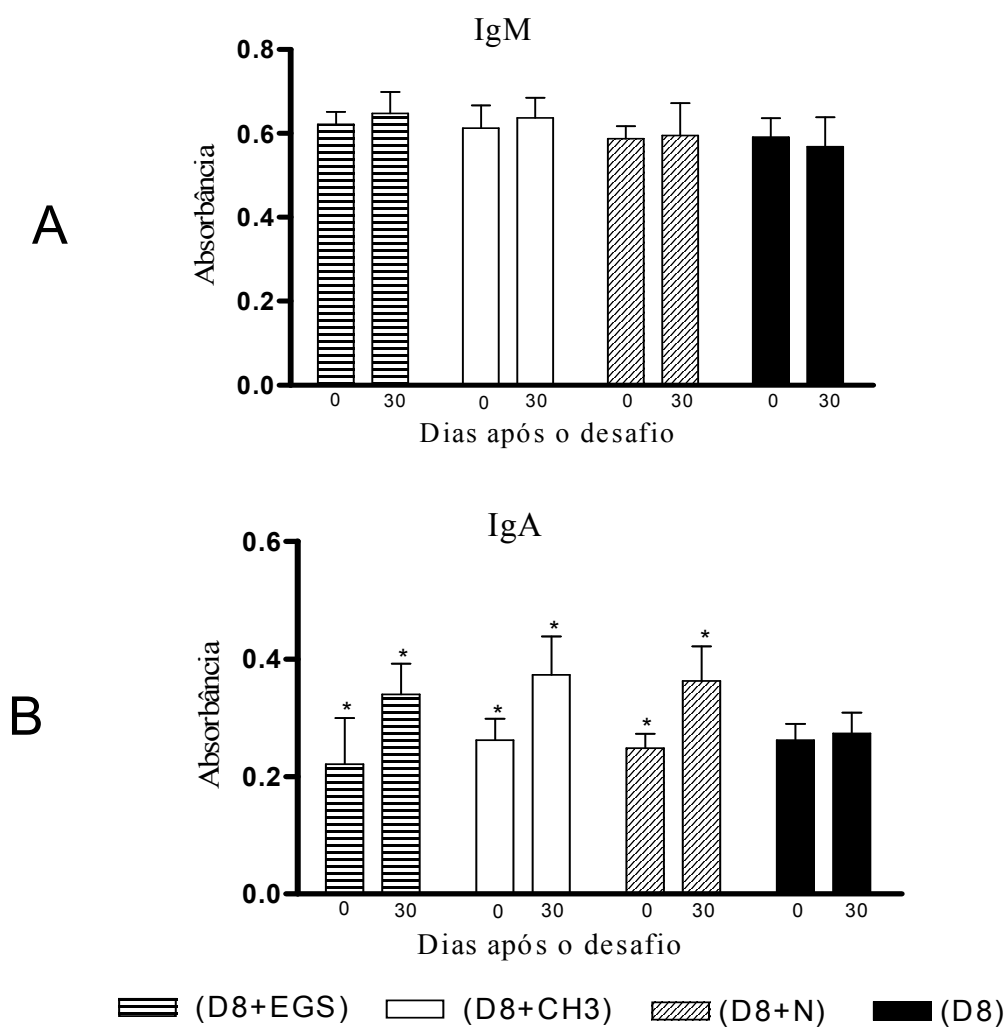


GRÁFICO 6 - Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepa EGS, CH3 e N. A - IgM e B - IgA. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio. * - $p < 0,05$.

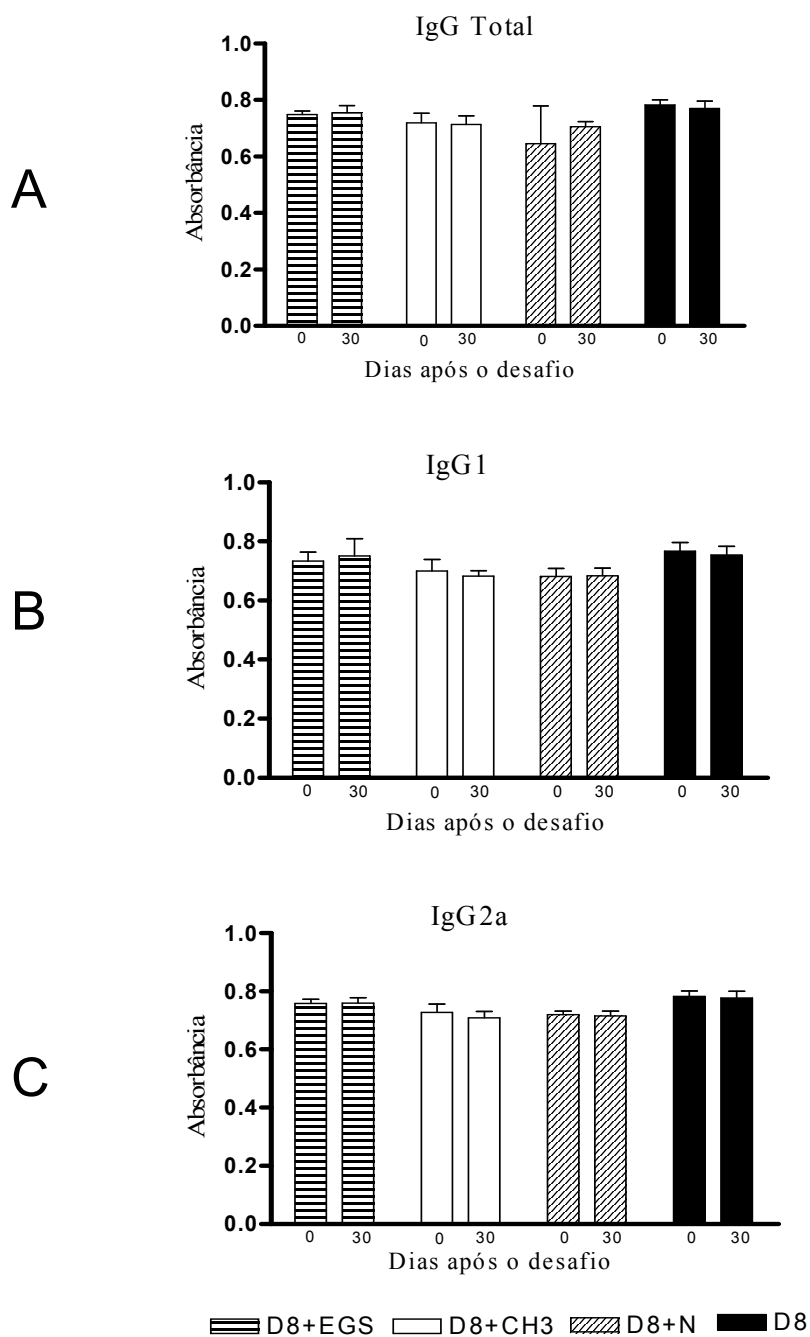


GRÁFICO 7 - Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 180 dias com as cepa EGS, CH3 e N. A - IgG total, B - IgG1 e C - IgG2a. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

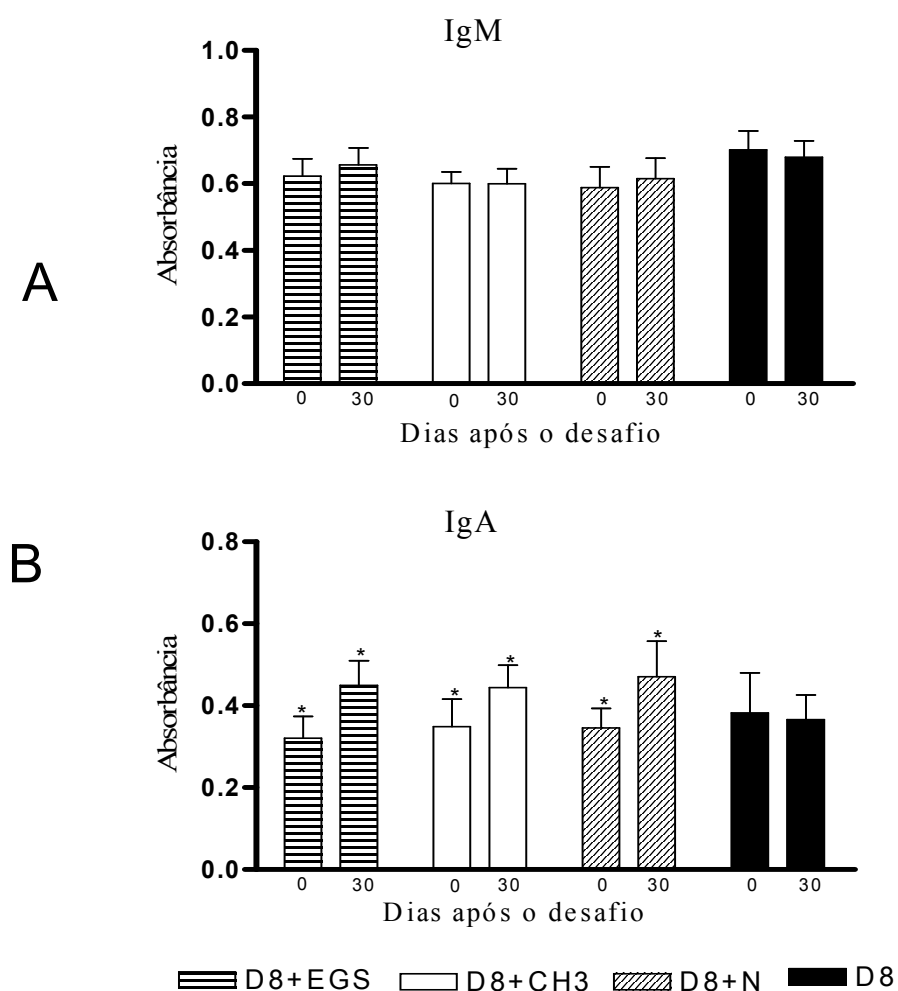


GRÁFICO 8 - Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 180 dias com as cepa EGS, CH3 e N. A - IgM e B - IgA. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio. * - $p < 0,05$.

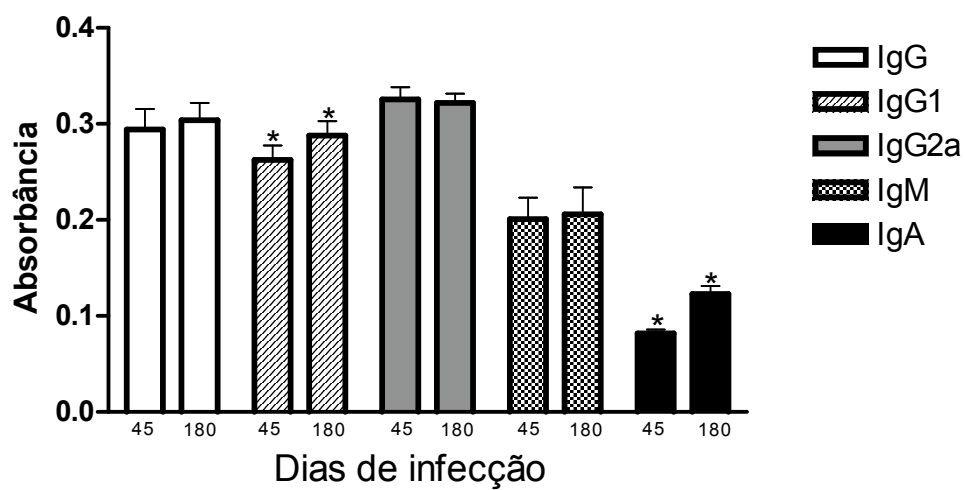


GRÁFICO 9 - Anticorpos específicos IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos BALB/c com 45 e 180 dias de infecção com a cepa D8. * $p < 0,05$

5.4 - Avaliação comparativa do reconhecimento antigênico de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N de *T. gondii* utilizando a técnica de “Western-Blotting”

A capacidade do desafio de camundongos BALB/c com as cepas EGS, CH3 e N após a primo infecção com a cepa D8 em estimular a neo-síntese de anticorpos IgG anti-*T. gondii* com diferentes especificidades foi verificada através da técnica de “Western-blotting”. Os plasmas dos camundongos BALB/c coletados após 45 dias de infecção com a cepa D8 e novamente coletados 30 dias após o desafio com as cepas EGS, CH3 e N apresentaram padrão semelhante de reconhecimento antigênico. Os plasmas dos animais infectados somente com a cepa D8, também apresentaram o mesmo padrão de reconhecimento antigênico no dia 0 e 30. Os resultados obtidos para os plasmas dos camundongos infectados a 180 dias com a cepa D8 e dos animais desafiados com as cepas EGS, CH3 e N apresentaram padrão semelhante de reconhecimento antigênico assim como os animais infectados somente com D8. Resultados representativos estão mostrados na FIG. 5.

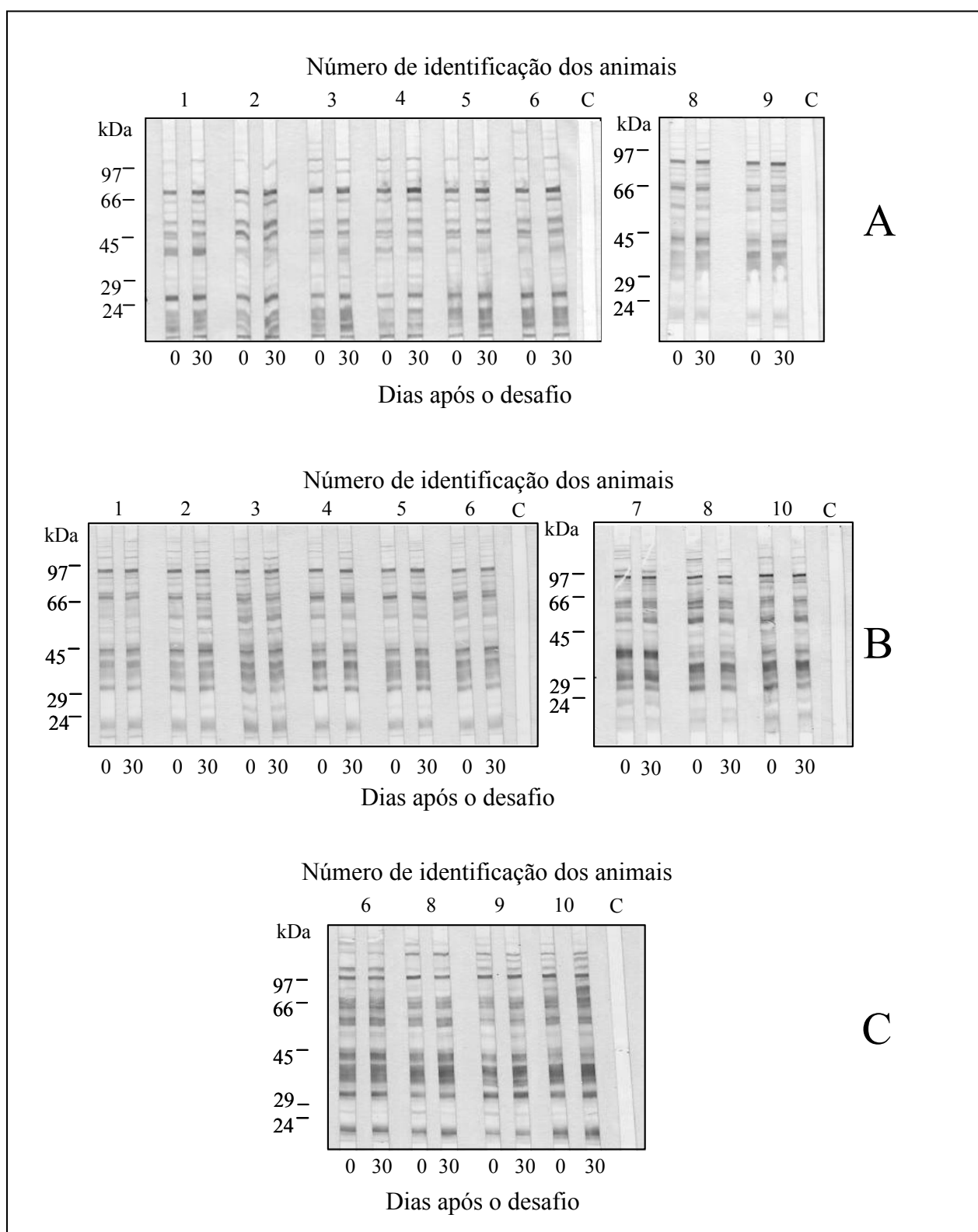


FIGURA 5 - “Western blotting” representativo em plasma de camundongos BALB/c coletado 180 dias após a primo infecção com a cepa D8, nos dias 0 e 30 após o desafio com as cepas EGS (A), CH3 (B) e N (C). Taquizoítos da cepa RH (10^6) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % e transferidos para membrana de nitrocelulose. kDa = Marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda da figura. C = controle negativo da reação.

5.5 - Dosagem de INF- γ e IL-10 de camundongos BALB/C após 45 e 180 dias da infecção com a cepa D8

A síntese de INF- γ e IL-10 por esplenócitos de camundongos BALB/c foi avaliada aos 45 e 180 após a primo infecção com a cepa D8 de *T. gondii*. Aos 45 dias ou 180 dias foi observado um aumento significativo na produção de INF- γ após estimulação com STAg, quando comparado aos animais não infectados submetidos ao mesmo estímulo. Entretanto não houve diferença significativa entre os níveis de INF- γ em animais com 45 e 180 dias da primo infecção com a cepa D8 (GRAF. 10).

Aos 45 e 180 dias após a primo infecção com a cepa D8 ficou evidenciado um aumento na produção de IL-10 após cultivo de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com STAg quando comparado aos animais não infectados submetidos ao mesmo estímulo. O aumento observado na produção de IL-10 foi significativamente maior nos animais com 180 dias de infecção com a cepa D8 quando comparado ao aumento observado nos animais com 45 dias de infecção com D8 ($p < 0,05$) (GRAF. 11).

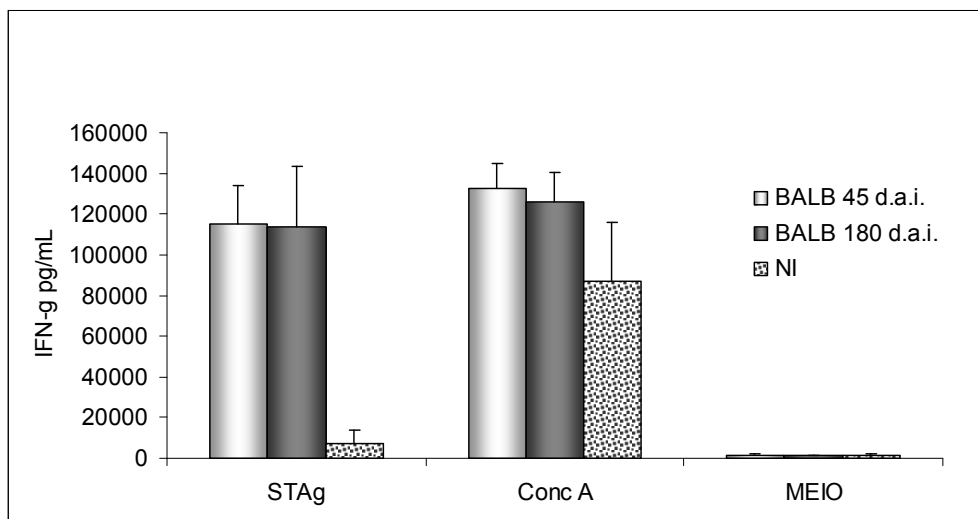


GRÁFICO 10 - Níveis de INF- γ em camundongos BALB/c infectados por via oral com 20 cistos da cepa D8 de *T. gondii* aos 45 dias após a infecção (BALB 45 d.a.i.), 180 dias após a infecção (BALB 180 d.a.i.) e não infectado (NI). Os valores mostram a média de oito animais.

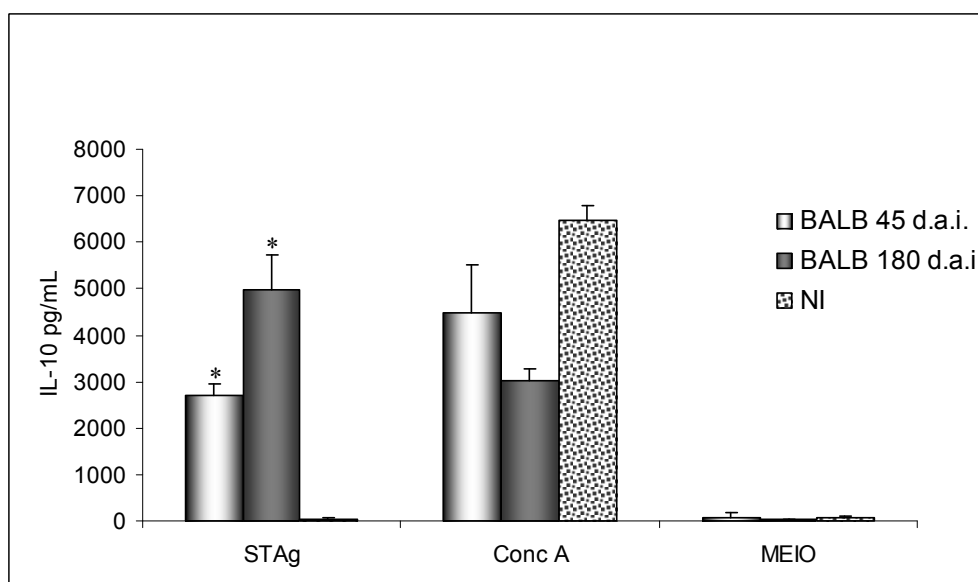


GRÁFICO 11 - Níveis de IL-10 em camundongos BALB/c infectados por via oral com 20 cistos da cepa D8 de *T. gondii* aos 45 dias após a infecção (BALB 45 d.a.i.), 180 dias após a infecção (BALB 180 d.a.i.) e não infectado (NI). Os valores mostram a média de oito animais.
* $p < 0,05$

5.6 – Avaliação histopatológica do cérebro de camundongos BALB/c infectados com *T. gondii*

O exame histopatológico foi realizado para avaliar a inflamação no cérebro de camundongos, trinta dias após o desafio. Os parâmetros avaliados para se determinar a inflamação foram: presença e quantidade de infiltrados perivasculares e nódulos gliais. Também foi avaliada a presença de necrose.

A inflamação observada no cérebro dos camundongos BALB/c desafiados aos 45 dias da primo infecção com a cepa D8 foi discreta e nenhum animal apresentou necrose (FIG. 6). Os animais do grupo infectado somente com a cepa D8 não apresentaram nódulos gliais e somente um animal apresentou infiltrado inflamatório perivascular e necrose (TAB. 5). Em geral, os camundongos BALB/c desafiados aos 45 dias com EGS, CH3 ou N apresentaram aumento no número de nódulos gliais e infiltrados perivasculares quando comparados aos camundongos primo infectados com a cepa D8. Este aumento foi significativo para o número de nódulos gliais nos animais desafiados com a cepa EGS (grupo A) ou N (grupo C) quando comparado aos animais do grupo infectado somente com D8 (grupo D) (TAB. 5). Nos animais desafiados com a cepa CH3 (grupo B) foi observado um número estatisticamente maior de infiltrados perivasculares quando comparados aos animais infectados somente com a cepa D8. No grupo desafiado com a cepa N (grupo C) foi observado um animal com taquizoítos livres no cérebro.

Os cérebros dos animais desafiados com EGS, CH3 ou N aos 180 dias da primo infecção com a cepa D8 e cérebros de animais infectados somente com D8 apresentaram inflamação discreta (TAB. 6). Diferente do que foi observado aos 45 dias, a necrose estava presente no cérebro de pelo menos um animal de cada grupo (FIG. 7 e TAB. 6). Não foi observada diferença estatística quando comparado o número de infiltrados perivasculares e nódulos gliais dos animais desafiados com as cepas EGS, CH3 e N (grupos H, I e J) em relação aos animais infectados somente com a cepa D8 (grupo K).

Foi também realizada análise comparativa entre os grupos de animais primo infectados e desafiados aos 45 e 180 dias. Em geral o cérebro dos camundongos desafiados aos 180 dias após a primo infecção apresentou menor número de nódulos gliais e infiltrados perivasculares quando comparados aos cérebros de camundongos desafiados aos 45 dias após a primo infecção. Aos 45 dias foi observada uma inflamação mais exacerbada nos cérebros dos camundongos desafiados com a cepa EGS (grupo A) em relação aos animais desafiados com

EGS aos 180 dias (grupo H). Esta inflamação foi evidenciada por um número estatisticamente maior de infiltrados perivasculares e nódulos gliais no grupo A ($p < 0,05$). A inflamação também foi mais intensa nos animais desafiados com CH3 aos 45 dias (grupo B) que nos animais desafiados com CH3 aos 180 dias (grupo I). Camundongos do grupo B apresentaram um número estatisticamente maior de infiltrados perivasculares ($p < 0,05$). Nos demais grupos, animais infectados somente com a cepa D8 e animais desafiados com a cepa N, não foram observadas diferenças significativas.

TABELA 5 - Presença de necrose, número médio de nódulos gliais e infiltrados inflamatórios perivasculares em grupos de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N do *T. gondii*.

Cepas	Grupo	Necrose*	Nódulo Glial**	Infiltrado Perivascular**
D8+EGS	A	0/8	1,37±1,50 ^a	1,12±1,12
D8+CH3	B	0/7	1,42±1,61	1,14±1,21 ^b
D8+N	C	0/8	1,62±1,50 ^a	1,12±1,24
D8	D	1/8	0	0,25±0,70

* Número de camundongos com necrose sobre o total de camundongos estudados.

** Número médio de nódulos gliais ou infiltrados inflamatórios perivasculares em uma área total de $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$.

^a aumento significativo ($p < 0,05$) de nódulos gliais em relação ao controle não desafiado - group D.

^b aumento significativo ($p < 0,05$) de infiltrados inflamatórios em relação ao controle não desafiado - group D.

TABELA 6 - Presença de necrose, número médio de nódulos gliais e infiltrados inflamatórios perivasculares em grupos de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 e desafiados aos 180 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N do *T. gondii*.

Cepas	Grupos	Necrose*	Nódulo Glial**	Infiltrado Perivascular**
D8+EGS	H	4/8	0,2±0,42	0,2±0,4
D8+CH3	I	1/9	0	0
D8+N	J	1/4	0,11±0,33	0
D8	K	2/9	0	0

* Número de camundongos com necrose sobre o total de camundongos estudados.

** Número médio de nódulos gliais ou infiltrados inflamatórios perivasculares em uma área total de $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$.

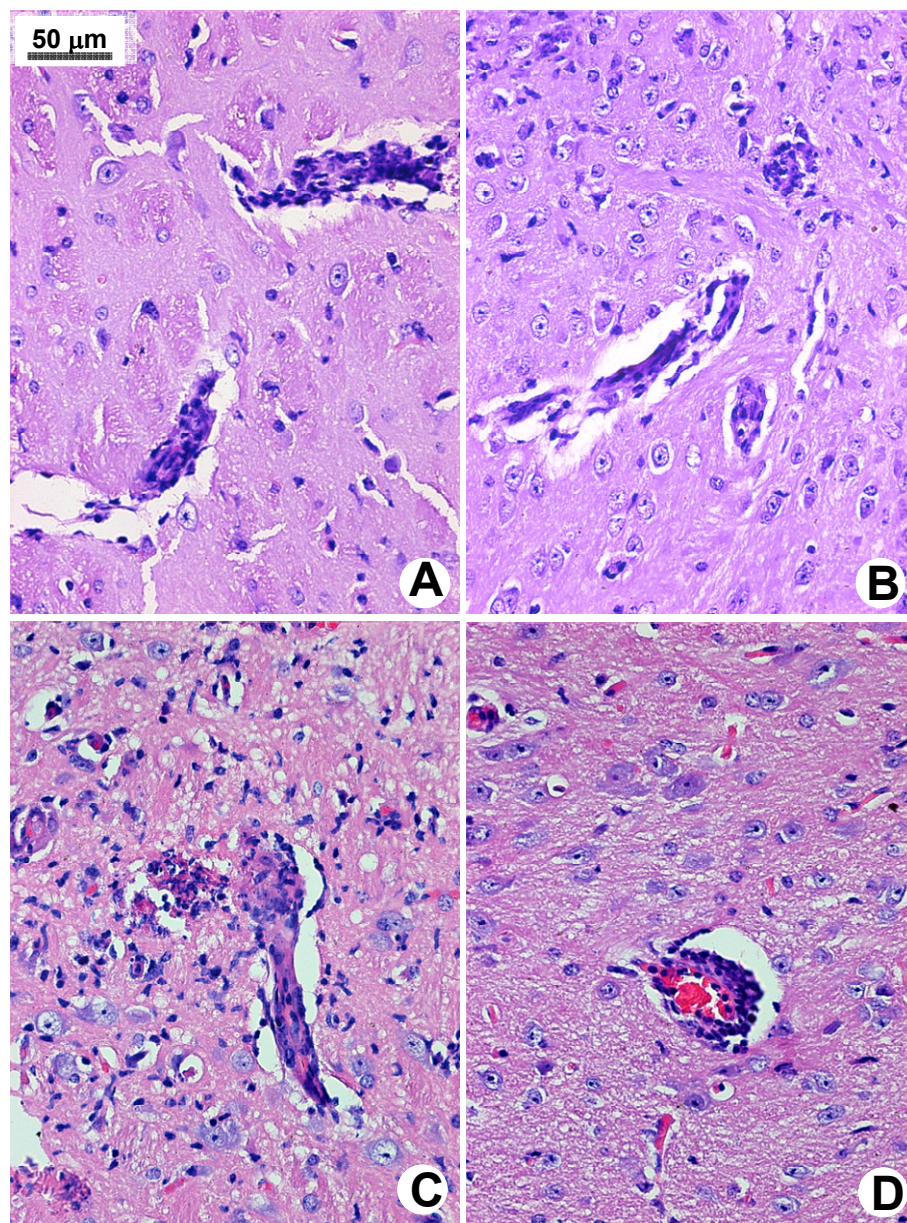


FIGURA 6 – Corte histológico mostrando infiltrado inflamatório perivascular no cérebro de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 (D) e desafiados aos 45 dias da primo infecção com as cepas EGS (A), CH3 (B) e N (C) do *T. gondii*. Hematoxilina Eosina.

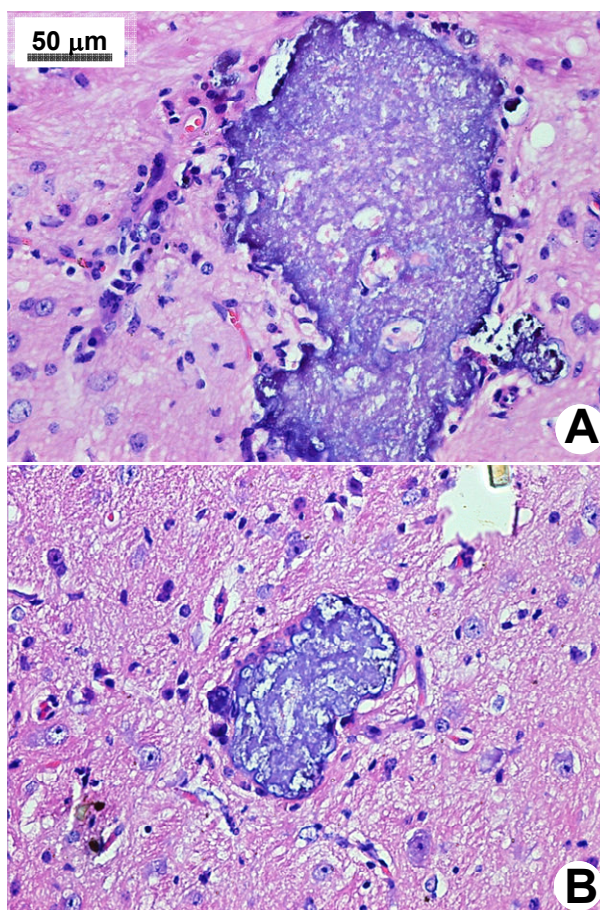


FIGURA 7 – Corte histológico mostrando necrose no cérebro de camundongos BALB/c infectados com a cepa D8 (B) e desafiados aos 180 dias da primo infecção com a cepa EGS (A) do *T. gondii*. Hematoxilina Eosina.

5.7 – Avaliação da mortalidade e do bioensaio de camundongos C57BL/6 desafiados aos 45 e 180 dias após a primo infecção com a cepa D8

5.7.1 - Desafio 45 dias após a infecção primária

Os camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 (grupo R) e desafiados com as cepas EGS (grupo O) e CH3 (grupo P) apresentaram 85,7% de sobrevivência durante os trinta dias de acompanhamento (GRAF. 12). Os animais desafiados com a cepa N (grupo Q) apresentaram 0% de sobrevivência. Os camundongos primo infectados com EGS (grupo S), CH3 (grupo T) e N (grupo U) apresentaram 100% de mortalidade (GRAF. 12). O número de cistos no cérebro de camundongos desafiados com as cepas EGS (grupo O) e CH3 (grupo P) 45 dias após a primo infecção com a cepa D8 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos animais infectados apenas com a cepa D8 (grupo R) (GRAF. 15, TAB. 7).

No bioensaio, os camundongos infectados com cistos provenientes do cérebro de camundongos infectados somente com D8 (grupo R) apresentaram 50% de sobrevivência. Os animais infectados com cistos provenientes dos cérebros de camundongos desafiados com EGS (grupo O) e CH3 (grupo P) apresentaram 16,7% de sobrevivência. Os camundongos sobreviventes da bioprova apresentaram cistos no cérebro e ELISA positiva para *T. gondii* (TAB. 7).

5.7.2 - Desafio 180 dias após a infecção primária

Em uma primeira tentativa, não foi possível a realização de experimento de reinfecção após 180 dias da primo infecção com os camundongos C57BL/6. Os camundongos C57BL/6 infectados com 20 cistos da cepa D8 morreram a partir de 72 dias após a primo infecção. Aos 180 dias da primo infecção somente dois (5,7%) camundongos sobreviveram. A curva de mortalidade destes animais está representada no GRAF. 13.

Numa segunda tentativa foi possível realizar o experimento de reinfecção após 180 dias da primo infecção com os camundongos C57BL/6. Entretanto, este experimento foi realizado com um número reduzido de animais. Dos 40 camundongos infectados com os 20 cistos da cepa D8 somente 17 sobreviveram aos 180 dias de infecção. Portanto, o grupo

infectado apenas com a cepa D8 (grupo Z) teve um total de cinco animais e os grupos D8+EGS (V), D8+CH3 (X) e D8+N (Y) foram constituídos por um total de quatro animais cada. Os grupos primo infectados EGS (grupo AA), CH3 (grupo BB) e N (grupo CC) foram constituídos por um total de cinco animais cada.

Os camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 (grupo Z) apresentaram 40% de sobrevivência durante os trinta dias de acompanhamento (GRAF. 14 e TAB. 8). Os animais desafiados com as cepas EGS (grupo V), CH3 (grupo X) e N (grupo Y) apresentaram 25%, 50% e 0% de sobrevivência, respectivamente. Os camundongos primo infectados com EGS (grupo AA), CH3 (grupo BB) e N (grupo CC) apresentaram 100% de mortalidade (GRAF. 14 e TAB. 8). Não foi possível realizar a análise estatística para o número de cistos cerebrais devido ao pequeno número de sobreviventes (GRAF. 16 e TAB. 8).

No bioensaio, um dos dois camundongos infectados com cistos provenientes do cérebro de camundongos do grupo D8 morreu. Os animais infectados com cistos provenientes dos cérebros de camundongos sobreviventes do grupo D8+EGS e D8+CH3 apresentaram 0% de sobrevivência (TAB. 8).

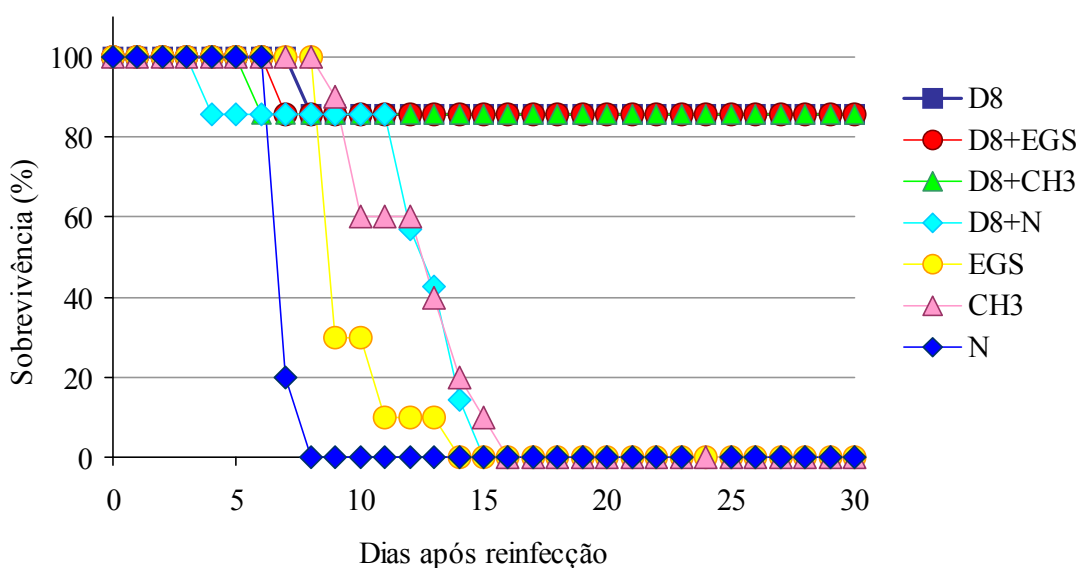


GRÁFICO 12 - Sobrevivência de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N após 45 dias de infecção. Controles primo infectados com as cepas D8, EGS, CH3 e N.

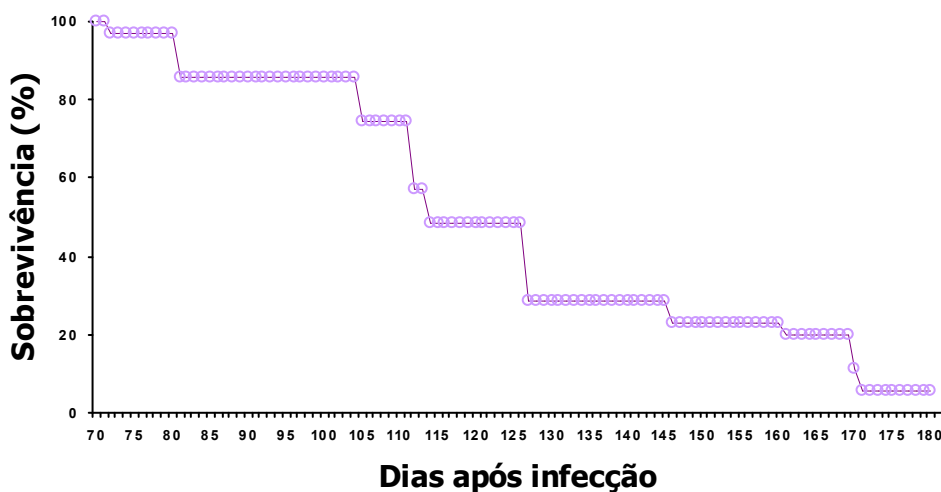


GRÁFICO 13 - Sobrevivência dos camundongos C57BL/6 infectados com 20 cistos da cepa D8 do *T. gondii* e acompanhados por 180 dias.

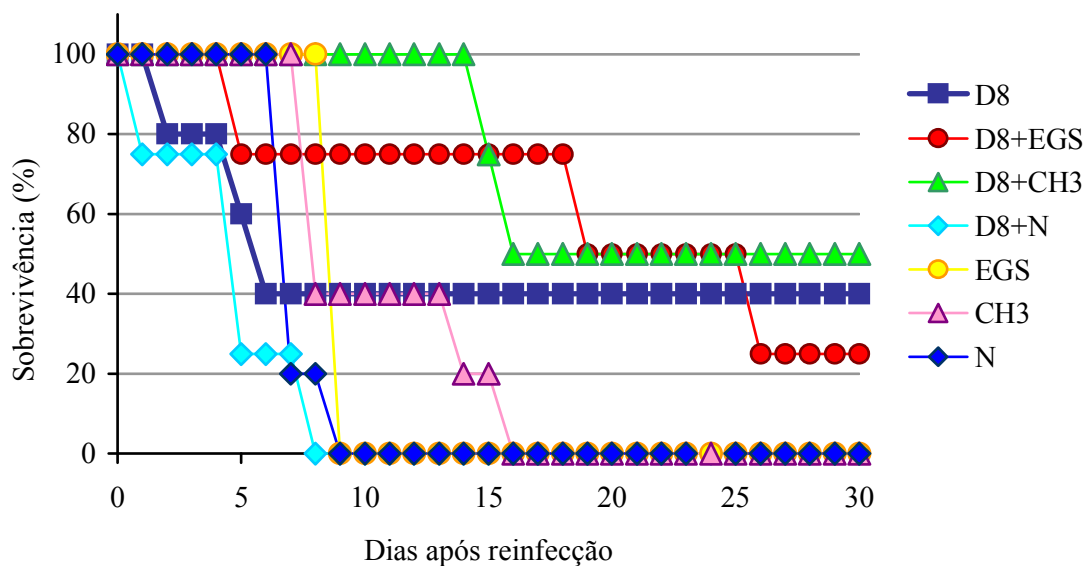


GRÁFICO 14 - Sobrevivência de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N após 180 dias de infecção. Controles primo infectados com as cepas D8, EGS, CH3 e N.

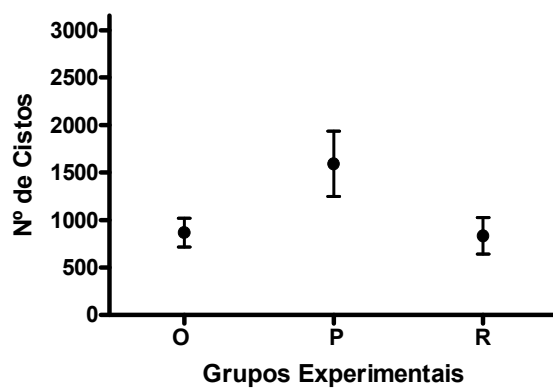


GRÁFICO 15 - Número médio de cistos no cérebro de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS e CH3. Grupos experimentais: animais primo infectados com a cepa D8 (grupo R) e animais primo infectados com D8 e desafiados aos 45 dias com as cepas EGS (grupo O), CH3 (grupo P).

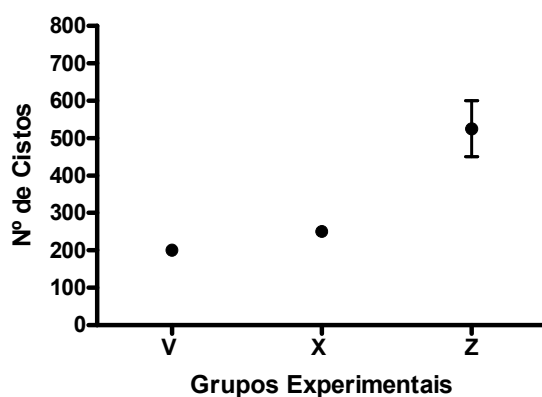


GRÁFICO 16 - Número médio de cistos no cérebro de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS e CH3. Grupos experimentais: animais primo infectados com a cepa D8 (grupo Z) e animais primo infectados com D8 e desafiados aos 180 dias com as cepas EGS (grupo V), CH3 (grupo X).

TABELA 7 - Percentagem de sobrevivência e número de cistos cerebrais em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 dias com as cepas EGS, CH3 e N. O bioensaio foi avaliado por sobrevivência, presença de cistos cerebrais e anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfecção.

Desafio 45 dias após a primo infecção						
Cepas	Grupos	Reinfecção		Bioensaio		
		Sobrevivência ^a	Número de Cistos	Sobrevivência ^a	Cistos ^b	Anticorpos ^c
D8+EGS	O	85,7% (6/7)	866,7±373,1	16,7% (1/6)	1/1	1/1
D8+CH3	P	85,7% (6/7)	1592±841,7	16,7% (1/6)	1/1	1/1
D8+N	Q	0% (0/7)	-	-	-	-
D8	R	85,7% (6/7)	833,3±471,9	50% (3/6)	3/3	3/3
EGS	S	0% (0/10)	-	-	-	-
CH3	T	0% (0/10)	-	-	-	-
N	U	0% (0/10)	-	-	-	-

a - camundongos vivos/ camundongos inoculados (30 dias após reinfecção)

b - camundongos com presença de cistos cerebrais/ total de camundongos

c - camundongos com anticorpos IgG (ELISA) anti-*T. gondii*/ total de camundongos

Cada experimento foi repetido e os resultados confirmados.

TABELA 8 - Percentagem de sobrevivência e número de cistos cerebrais em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N. O bioensaio foi avaliado por sobrevivência, presença de cistos cerebrais e anticorpos nos camundongos inoculados com cistos provenientes do cérebro dos animais do experimento de reinfeção.

		Desafio 180 dias após a primo infecção				
		Reinfecção		Bioensaio		
Cepas	Grupos	Sobrevivência ^a	Número de Cistos	Sobrevivência ^a	Cistos ^b	Anticorpos ^c
D8+EGS	V	25% (1/4)	200	0% (0/1)	-	-
D8+CH3	X	50% (2/4)	250 ±0	0% (0/2)	-	-
D8+N	Y	0% (0/4)	-	-	-	-
D8	Z	40% (2/5)	525±106,1	50% (1/2)	1/1	1/1
EGS	AA	0% (0/5)	-	-	-	-
CH3	BB	0% (0/5)	-	-	-	-
N	CC	0% (0/5)	-	-	-	-

a - camundongos vivos/ camundongos inoculados (30 dias após reinfeção)

b - camundongos com presença de cistos cerebrais/ total de camundongos

c - camundongos com anticorpos IgG (ELISA) anti-*T. gondii*/ total de camundongos

5.8 - Tipagem genética de re-isolados de *T. gondii* em camundongos C57BL/6 desafiados 45 e 180 dias após primo infecção

5.8.1 – Camundongos desafiados aos 45 dias

A tipagem genética dos re-isolados dos camundongos C57BL/6 não foi realizada para os animais desafiados com a cepa N (grupo Q), pois no grupo ocorreu 100% de mortalidade após a reinfecção.

Utilizando-se o marcador *cS10-A6* e a endonuclease de restrição *RsaI* foi realizada a análise das amostras de *T. gondii* obtidas do “pool” de cérebros por grupo. Este marcador confirmou a coexistência das cepas D8 e EGS e das cepas D8 e CH3 em camundongos C57BL/6 desafiados aos 45 dias da primo infecção (TAB. 9 e FIG. 8A). A análise do DNA individual revelou que 100% dos animais desafiados com as cepas EGS e CH3 se reinfectaram (TAB. 9, FIG. 10A).

Como dito anteriormente, a PCR-RFLP utilizando-se o “primer” *L363* e a endonuclease de restrição *HpyCH4IV* não é adequada para mostrar a ocorrência de reinfecção com as cepas CH3 e EGS, pois só permite a distinção entre as cepas D8 e N, indicando, portanto, neste experimento, apenas a presença ou não do parasito na amostra avaliada (FIG. 8B).

5.8.2 – Camundongos desafiados aos 180 dias

Da mesma forma que para os camundongos desafiados aos 45 dias com a cepa N (grupo Q) os animais desafiados com a cepa N aos 180 dias (grupo Y) apresentaram 100% de mortalidade no experimento de reinfecção e, portanto, a tipagem genética não foi realizada.

O marcador *cS10-A6* e a endonuclease de restrição *RsaI* permitiram identificar a coexistência das cepas EGS e D8 no cérebro do único camundongo C57BL/6 sobrevivente (TAB. 9 e FIG 9A). Ainda com o mesmo marcador foi evidenciada a coexistência das cepas D8 e CH3 na amostra do “pool” de cérebros (FIG. 9A) A análise do DNA individual deste grupo revelou que os dois camundongos desafiados com a cepa CH3 sobreviventes se reinfectaram (TAB. 9, FIG. 10B). O “primer” *L363* e a endonuclease de restrição *HpyCH4IV* indicou apenas a presença ou não do parasito na amostra avaliada (FIG. 9B).

TABELA 9 - Genotipagem dos loci *cS10-A6* e *L363* de cepas de *T. gondii* por PCR-RFLP. DNA foi extraído de taquizoítos obtidos do peritônio de camundongos “swiss” inoculados por via intraperitoneal 5-7 dias antes com cistos cerebrais de camundongos C57BL/6 sobreviventes primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias ou 180 dias com as cepas EGS e CH3.

Fonte de DNA	Desafio após 45 dias		Desafio após 180 dias	
	Locus		Locus	
	<i>cS10-A6</i>	<i>L363</i>	<i>cS10-A6</i>	<i>L363</i>
D8+EGS “pool”	Sim	NC ^b	Sim	NC
D8+CH3 “pool”	Sim	NC	Sim	NC
D8+EGS individual	6/6 ^a (100%)	NR ^c	1/1 (100%)	NR
D8+CH3 individual	6/6 (100%)	NR	2/2 (100%)	NR

a- n° de camundongos coinfetados com as duas cepas/ n° de camundongos total

b- NC: não conclusivo (*L363* só permite distinção entre as cepas D8 e N)

c- NR: não realizado

Sim – PCR positiva para ambas as cepas

Não – PCR positiva somente para a cepa D8 (primo infecção)

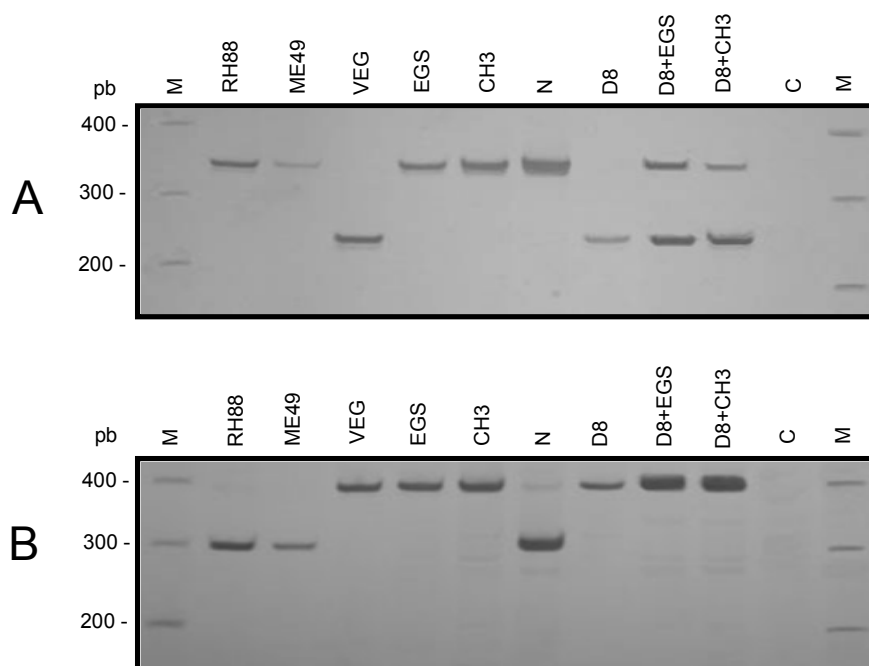


FIGURA 8 – PCR-RFLP em dois loci de *T. gondii*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfeção em DNA extraído de “pool” de cérebros de camundongos C57BL/6 45 dias após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA. **A:** PCR-RFLP do loco *cS10-A6* com a endonuclease de restrição *RsaI*. **B:** PCR-RFLP do loco *L363* com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*.

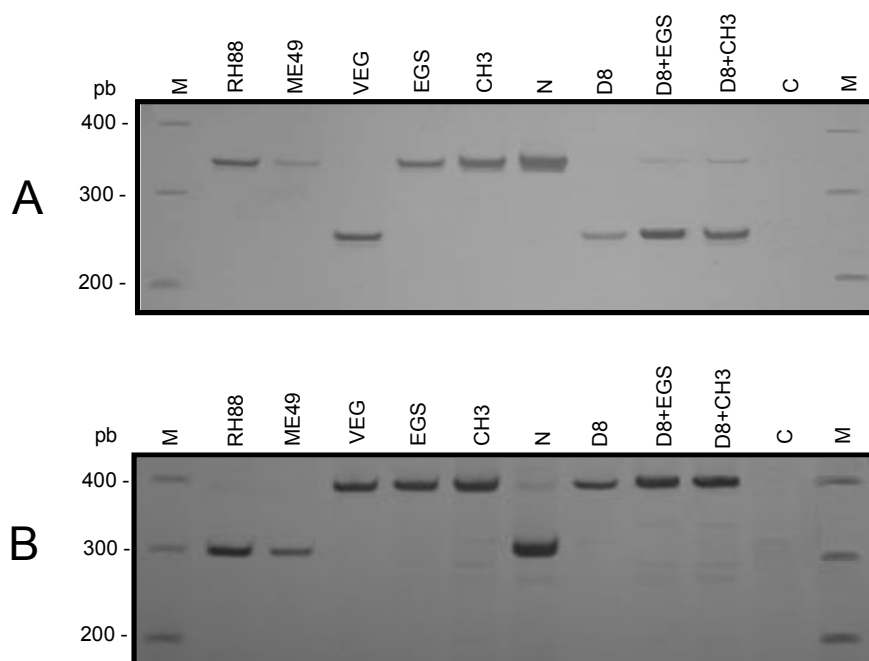


FIGURA 9 – PCR-RFLP em dois loci de *T. gondii*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfecção em DNA extraído de “pool” de cérebros de camundongos C57BL/6 180 dias após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA. **A:** PCR-RFLP do loco *cS10-A6* com a endonuclease de restrição *RsaI*. **B:** PCR-RFLP do loco *L363* com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV*.

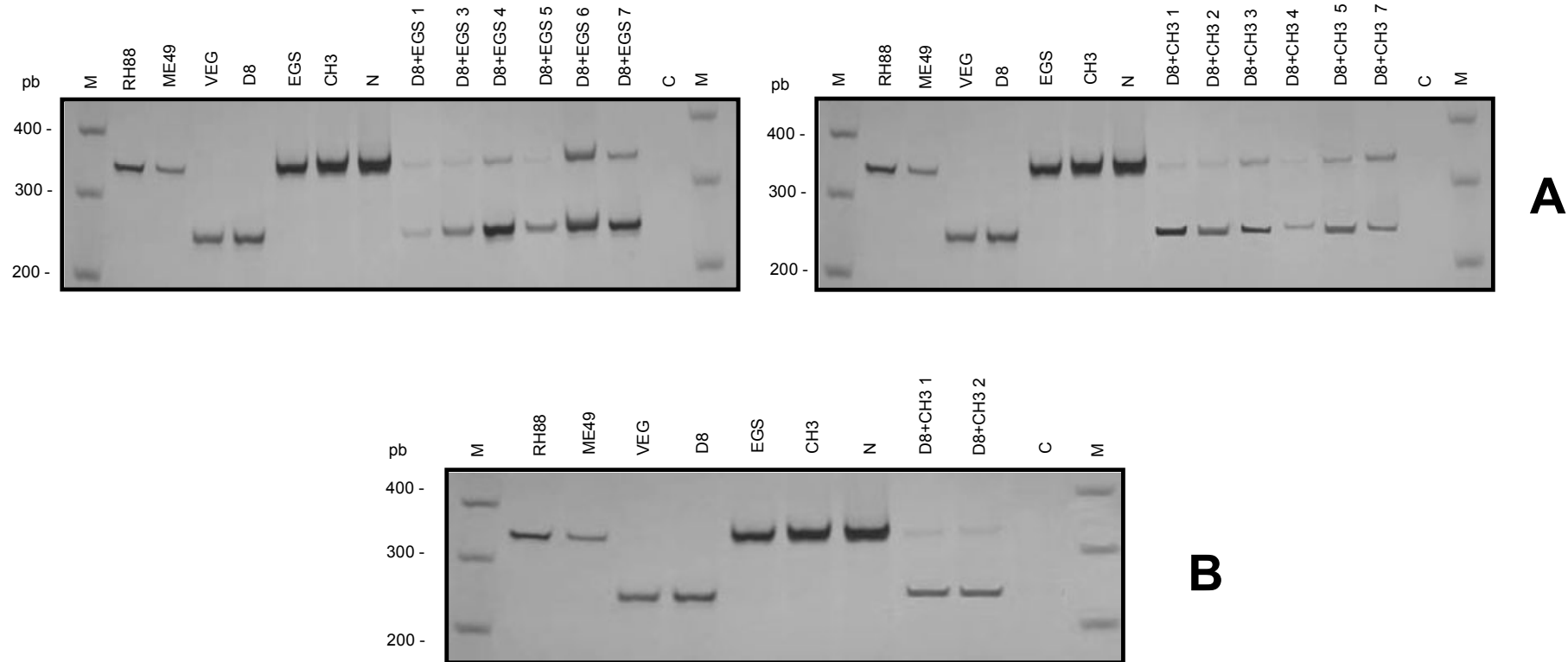


FIGURA 10 – PCR-RFLP do loco *cS10-A6* de *T. gondii* com a endonuclease de restrição *RsaI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para verificação da reinfecção em DNA extraído individualmente de cérebros de camundongos C57BL/6 45 dias (A) e 180 dias (B) após a primo infecção. As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = marcador de peso molecular (Promega 100pb), C= controle negativo, sem DNA.

5.9 - Anticorpos anti-*T. gondii* em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 e 180 dias com as cepas EGS, CH3 e N

5.9.1 - IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos desafiados aos 45 dias após a primo infecção com a cepa D8

A reatividade em absorbância de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a para *T. gondii* dosados no plasma dos animais infectados com a cepa D8 (grupo R) ou desafiados aos 45 dias com as cepas EGS (grupo O) e CH3 (grupo P) apesar de apresentar uma tendência de aumento no dia 30 em relação ao dia 0 não apresentou qualquer alteração significativa ($p>0,05$). (GRAF. 17 A, B e C).

5.9.2 - IgM e IgA em camundongos desafiados aos 45 dias após primo infecção com a cepa D8

A reatividade de IgM para *T. gondii* foi testada no plasma de animais infectados somente com D8 (grupo R) ou desafiados aos 45 dias com as cepas EGS (grupo O) e CH3 (grupo P). Apesar de ter sido observada uma tendência de queda na absorbância no dia 30, não foi evidenciada, para esta imunoglobulina, qualquer alteração significativa na absorbância dos plasmas coletados antes (dia 0) e após o desafio (trigésimo dia) ($p>0,05$) (GRAF. 18A).

A reatividade de IgA contra os antígenos de *T. gondii* apresentou um aumento significativo de absorbância no dia 30 em relação ao dia 0 somente para o plasma dos animais do grupo desafiado com EGS (grupo O) ($p<0,05$) (GRAF. 18B).

5.9.3 - IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos desafiados aos 180 dias após primo infecção com a cepa D8

A reatividade de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a para *T. gondii* no plasma dos animais infectados com a cepa D8 (grupo Z) ou desafiados aos 180 dias com EGS (grupo Y) e CH3 (grupo X) apresentou uma tendência de aumento na absorbância no dia 30 em comparação ao dia 0. Entretanto esta tendência não foi significativa para nenhum dos grupos testados ($p>0,05$) (GRAF. 19 A, B e C).

5.9.4 - IgM e IgA em camundongos desafiados aos 180 dias após primo infecção com a cepa D8

A reatividade de IgM e IgA contra antígenos de *T. gondii* nos animais infectados somente com D8 (grupo Z) ou desafiados aos 180 dias com as cepas EGS (grupo V) e CH3 (grupo X) não evidenciou qualquer alteração em relação à absorvância nos plasmas coletados antes (dia 0) e após o desafio (30º dia) ($p>0,05$) (GRAF. 20A e B).

5.9.5 – IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA em camundongos aos 45 e 180 dias de infecção com a cepa D8

A reatividade de IgG, IgM e IgA para antígenos de *T. gondii* nos animais com 45 dias de infecção com a cepa D8 não apresentou qualquer alteração na absorvância quando comparados aos animais com 180 dias de infecção com a cepa D8 ($p>0,05$). Já a reatividade de IgG1 e IgG2a para *T. gondii* apresentou uma tendência de aumento de absorvância nos plasmas dos camundongos C57BL/6 com 180 dias de infecção com a cepa D8 comparativamente aos plasmas dos animais com 45 dias de infecção ($p<0,05$). (GRAF. 21).

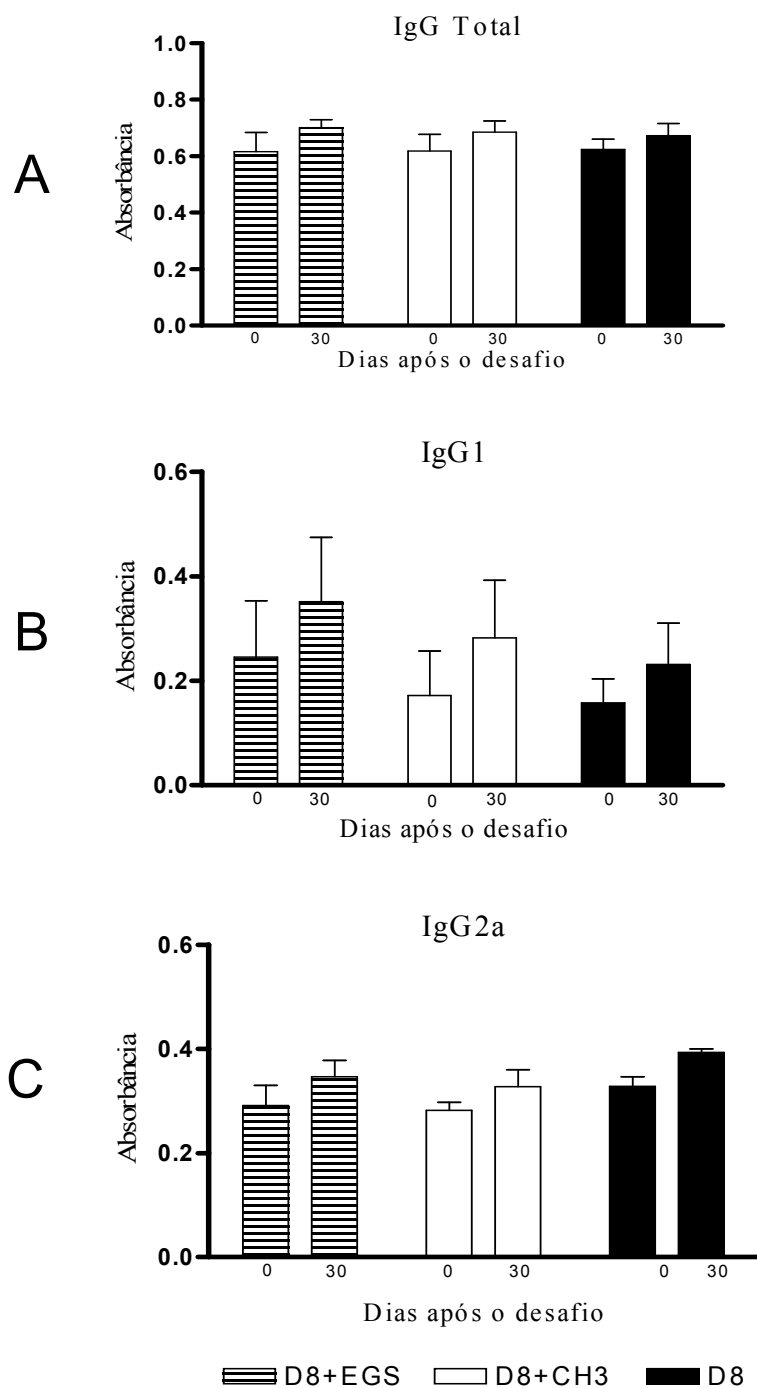


GRÁFICO 17 - Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepas EGS e CH3. A - IgG total, B - IgG1, C - IgG2a. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

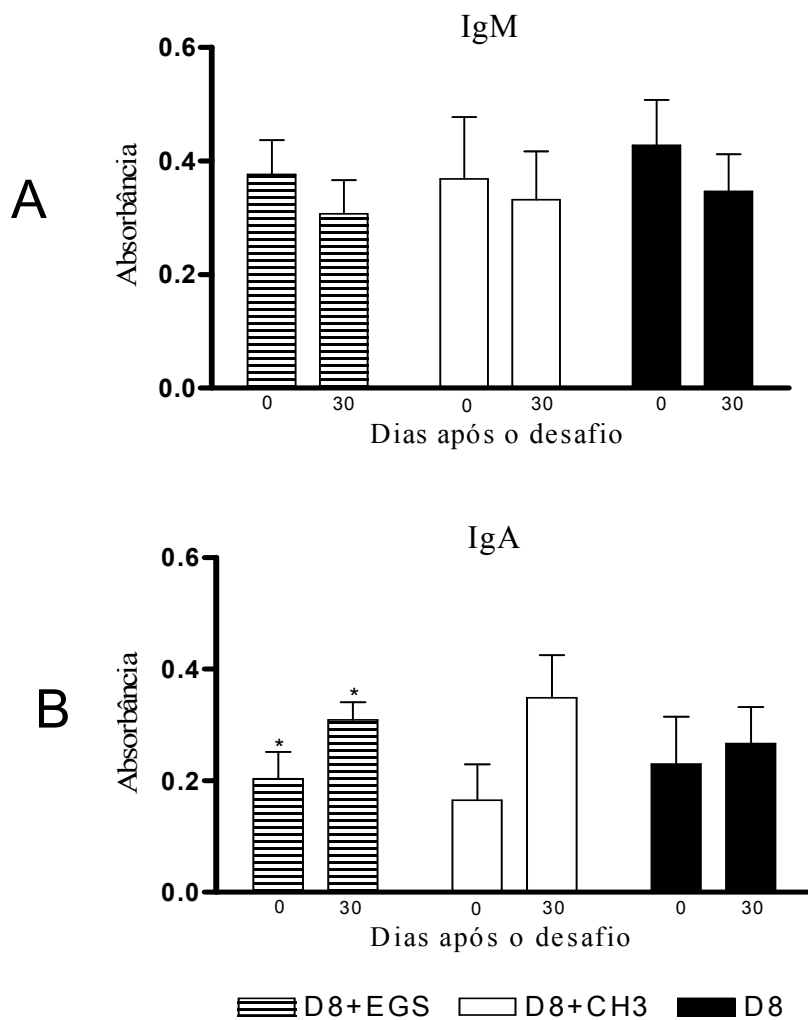


GRÁFICO 18 - Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 dias com as cepas EGS e CH3. A - IgM e B - IgA. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio. * - $p < 0,05$

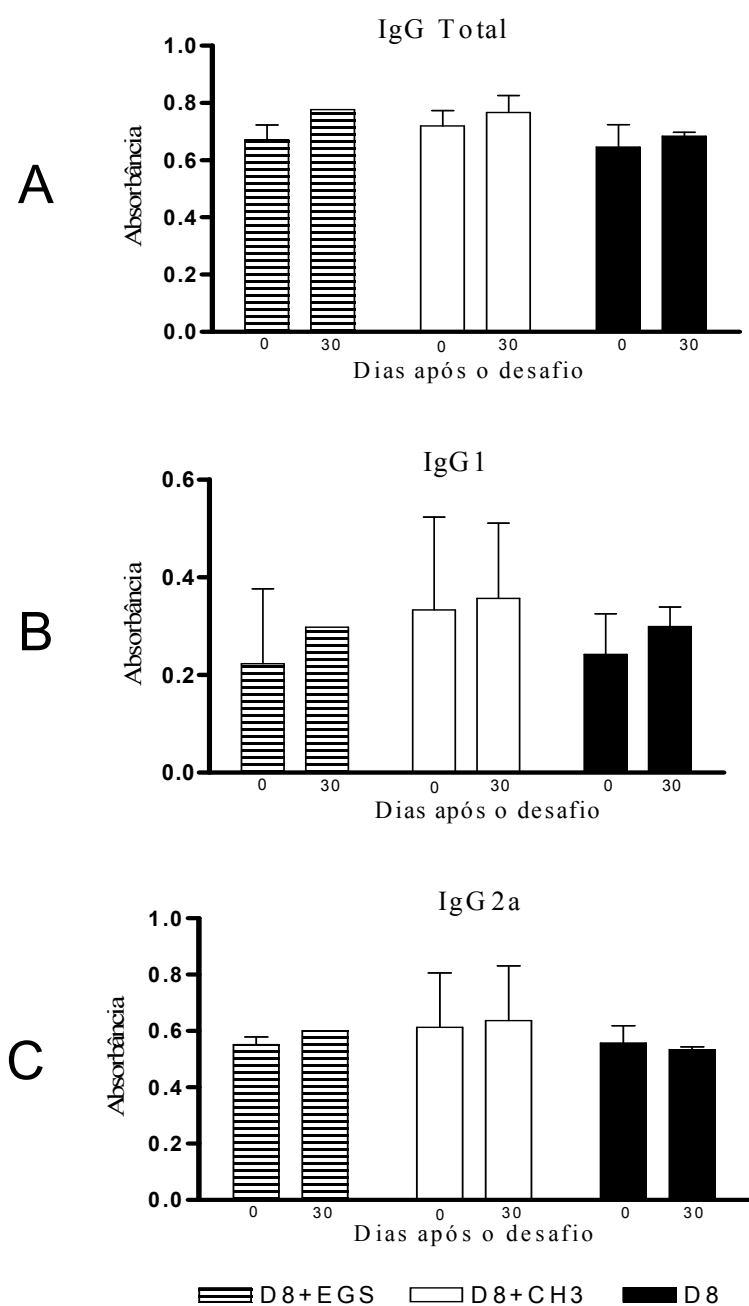


GRÁFICO 19 - Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 180 dias com as cepas EGS e CH3. A - IgG total, B - IgG1 e C - IgG2a. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

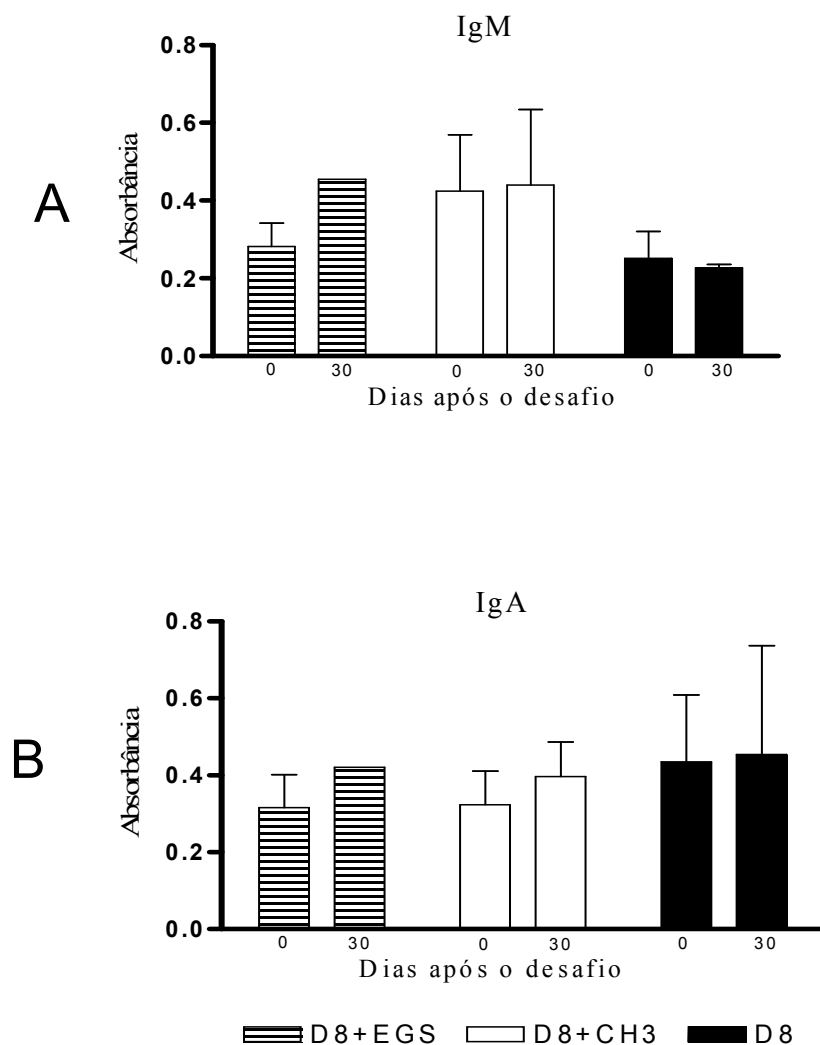


GRÁFICO 20 - Anticorpos específicos anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 180 dias com as cepas EGS e CH3. A - IgM e B - IgA. Plasma coletado antes (dia 0) e trinta dias após o desafio.

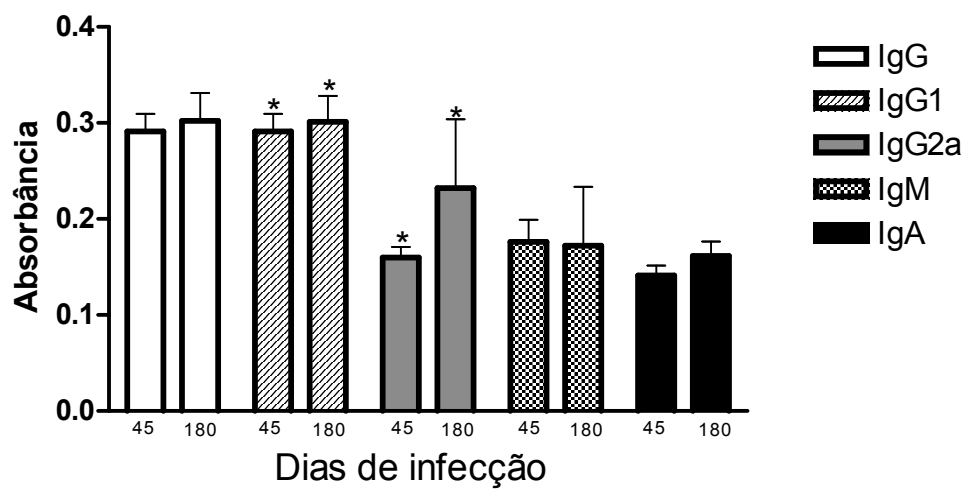


GRÁFICO 21 - Anticorpos específicos IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA anti-*T. gondii* detectados pela técnica de ELISA em plasma de camundongos C57BL/6 com 45 e 180 dias de infecção com a cepa D8. * $p < 0,05$

5.10 - Avaliação comparativa do reconhecimento antigênico de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados com as cepas EGS, CH3 e N do *T. gondii* utilizando a técnica de “Western-Blotting”

Os plasmas dos seis animais sobreviventes que haviam sido desafiados com a cepa EGS (grupo O) após 45 dias de infecção com a cepa D8 foram testados comparativamente no dia 0 antes do desafio e 30 dias após o desafio. Destes seis animais, quatro (animais 3, 5, 6 e 7) reconheceram uma proteína de aproximadamente 74 kDa após o desafio, quatro (animais 1, 3, 6 e 7) reconheceram uma proteína de aproximadamente 58 kDa e quatro (animais 1, 5, 6 e 7) uma proteína de aproximadamente 41 kDa. Dois camundongos (animais 3 e 4) reconheceram uma proteína de aproximadamente 63 kDa e dois animais (animais 5 e 7) reconheceram mais intensamente uma proteína de aproximadamente 49 kDa (FIG. 11A). Estas proteínas foram reconhecidas no dia 30 após o desafio e não foram reconhecidas ou fracamente reconhecidas pelo plasma destes animais no dia 0.

Os animais desafiados com a cepa CH3 (grupo P), 45 dias após a infecção com a cepa D8 apresentaram menor variação no reconhecimento antigênico no dia 30 em comparação ao dia 0. Seis animais sobreviveram aos trinta dias de experimento e destes, apenas um camundongo (animal 3) reconheceu uma proteína de aproximadamente 78 kDa e três camundongos (animais 2, 4 e 5) reconheceram mais intensamente uma proteína de aproximadamente 70 kDa (FIG. 11B).

Os animais desafiados 180 dias após a infecção com a cepa D8 também foram testados através da técnica de “Western-blotting”. O plasma do único animal sobrevivente do grupo desafiado com a cepa EGS (grupo V) reconheceu uma proteína de aproximadamente 63 kDa no dia 30 após o desafio, que estava ausente no dia 0 (FIG. 12A). Os dois animais sobreviventes no grupo desafiado com CH3 (grupo X) reconheceram mais intensamente uma proteína de aproximadamente 70 kDa. Além desta proteína, um camundongo (animal 1) reconheceu uma proteína de aproximadamente 78 kDa e outra proteína de aproximadamente 49 kDa (FIG. 12B).

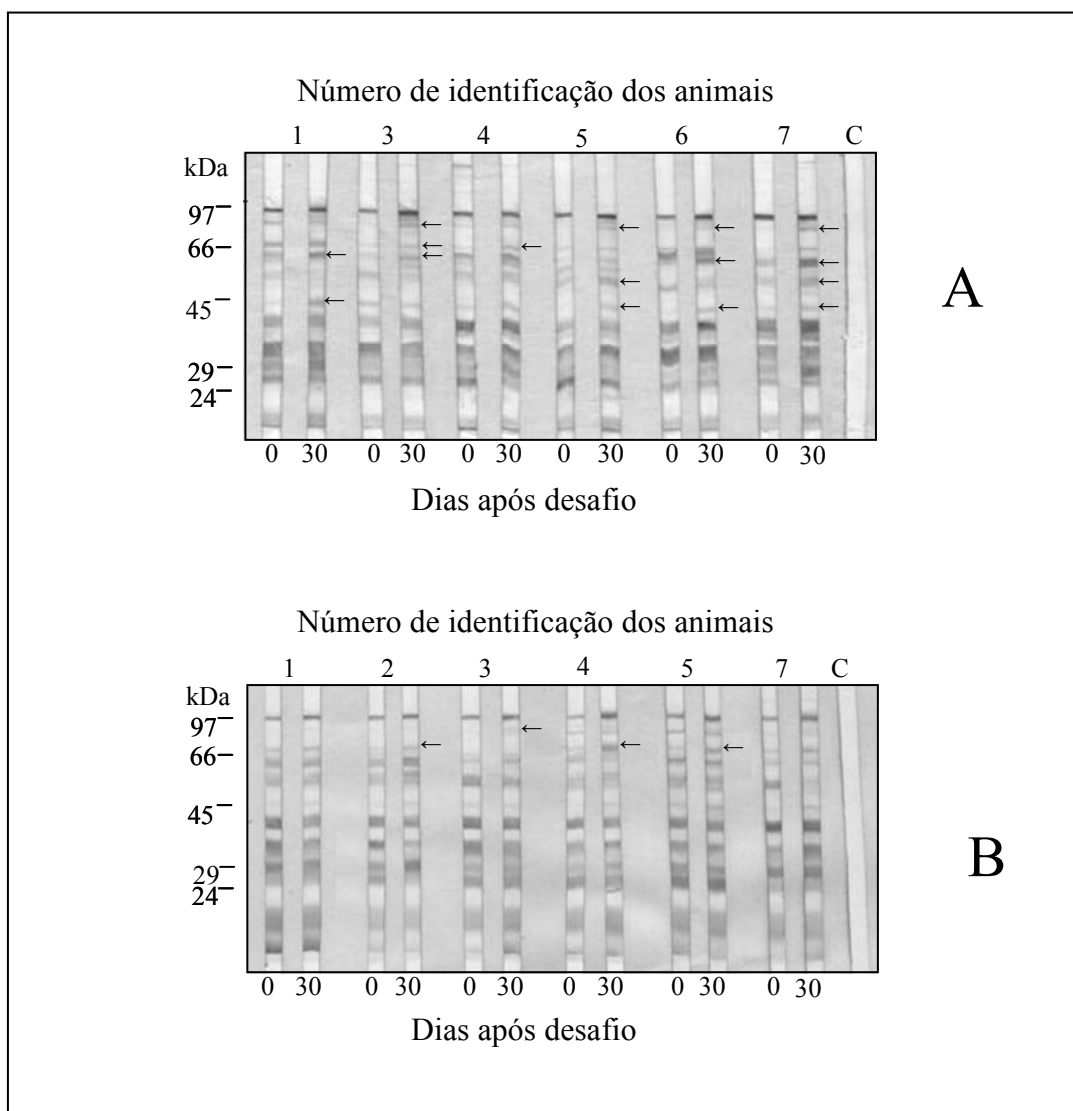


FIGURA 11 - “Western blotting” em plasma de camundongos C57BL/6 coletado 45 dias após a primo infecção com a cepa D8, nos dias 0 e 30 após o desafio com as cepas EGS (A) e CH3 (B). Taquizoítos da cepa RH (10^6) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % e transferidos para membrana de nitrocelulose. kDa = Marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda da figura. C = controle negativo da reação. As setas indicam proteínas que passaram a ser reconhecidas no dia 30.

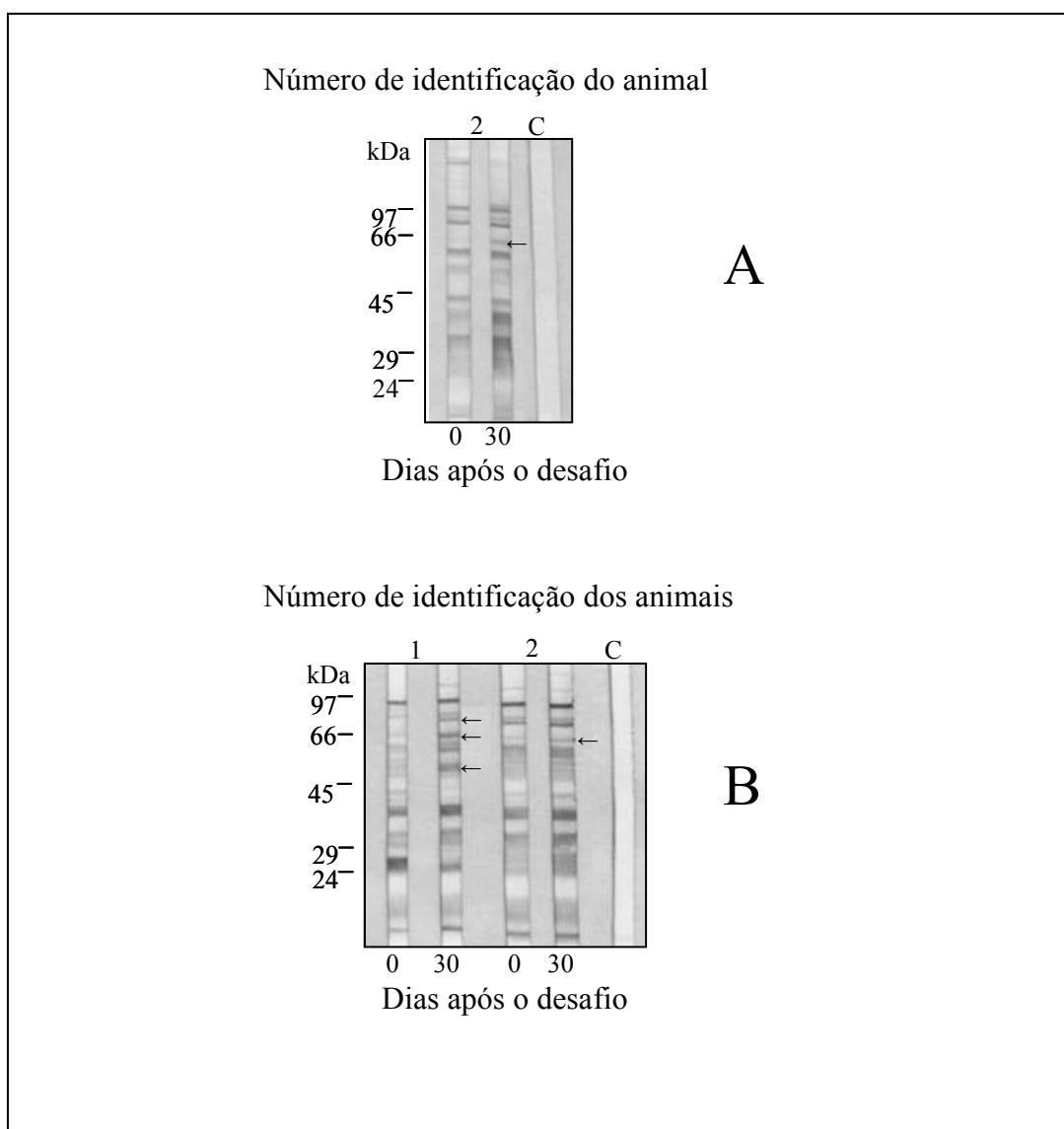


FIGURA 12 - “Western blotting” em plasma de camundongos C57BL/6 coletado 180 dias após a primo infecção com a cepa D8, nos dias 0 e 30 após o desafio com as cepas EGS (A) e CH3 (B). Taquizoítos da cepa RH (10^6) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % e transferidos para membrana de nitrocelulose. kDa = Marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda da figura. C = controle negativo da reação. As setas indicam proteínas que passaram a ser reconhecidas no dia 30.

5.11 - Dosagem de INF- γ e IL-10 de camundongos C57BL/6 45 e 180 dias da infecção com a cepa D8

A síntese de INF- γ e IL-10 por esplenócitos de camundongos C57BL/6 também foi avaliada aos 45 e 180 dias após a primo infecção com a cepa D8 de *T. gondii*. Aos 45 ou 180 dias da primo infecção com a cepa D8 foi observado um aumento na produção de INF- γ após estimulação com STAg quando comparado aos animais não infectados submetidos ao mesmo estímulo. Entretanto não houve diferença significativa entre os níveis de INF- γ em camundongos C57BL/6 com 45 e 180 dias da primo infecção com a cepa D8 (GRAF. 22).

Os esplenócitos dos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 foram também submetidos ao estímulo com STAg para realização da dosagem de IL-10. Entretanto a produção de IL-10 pelos esplenócitos de camundongos C57BL/6, tanto aos 45, como aos 180 dias da infecção com a cepa D8, não atingiu níveis significantes.

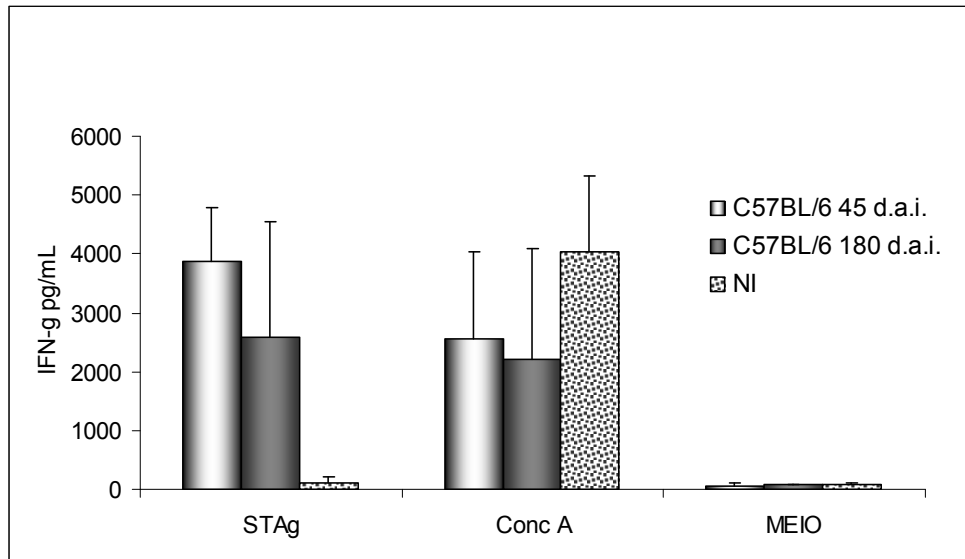


GRÁFICO 22 – Níveis de INF- γ em camundongos C57BL/6 infectados por via oral com 20 cistos da cepa D8 de *T. gondii* aos 45 dias após a infecção (C57BL/6 45 d.a.i.), 180 dias após a infecção (C57BL/6 180 d.a.i.) e não infectado (NI). Os valores mostram a média de quatro a oito animais.

5.12 - Avaliação histopatológica do cérebro de camundongos C57BL6 infectados com *T. gondii*

A inflamação observada no cérebro dos camundongos C57BL/6 desafiados aos 45 dias após a primo infecção com a cepa D8 e dos animais infectados somente com a cepa D8 foi discreta. Somente nos animais desafiados com a cepa EGS (grupo O) foi observada a ocorrência de necrose (TAB. 10). Não foi observada diferença estatística quando comparado o número de infiltrados perivasculares (FIG. 13) e nódulos gliais nos animais desafiados com as cepas EGS e CH3 (grupos O e P) em relação aos animais infectados somente com a cepa D8 (grupo R).

Os cérebros dos animais desafiados aos 180 dias da primo infecção com a cepa D8 e cérebros dos animais infectados somente com D8 também apresentaram inflamação discreta (FIG. 14). Nenhum animal avaliado apresentou necrose (TAB. 11). Não foi possível a realização do teste estatístico para estes animais, pois somente um camundongo sobreviveu no grupo de animais desafiados com a cepa EGS (grupo V) e dois sobreviveram no grupo desafiado com a cepa CH3 (grupo X).

A análise estatística não foi realizada quando o desafio foi feito 180 dias após a primo infecção devido ao pequeno número de animais sobreviventes.

TABELA 10 - Presença de necrose, número médio de nódulos gliais e infiltrados inflamatórios perivasculares em grupos de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N do *T. gondii*.

Cepas	Grupos	Necrose*	Nódulo Glial **	Infiltrado Perivascular**
D8+EGS	O	2/6	2,16±0,4	2,16±2,2
D8+CH3	P	0/6	2,5±2,34	2±1,67
D8+N	Q	NR	NR	NR
D8	R	0/6	1,5±1,37	1,83±1,47

* Número de camundongos com necrose sobre o total de camundongos estudados.

** Número médio de nódulos gliais ou infiltrados inflamatórios perivasculares em uma área total de $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$.

NR – Não realizado pois não houve sobreviventes após o desafio.

TABELA 11 - Presença de necrose, número médio de nódulos gliais e infiltrados inflamatórios perivasculares em grupos de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 e desafiados aos 180 dias da primo infecção com as cepas EGS, CH3 e N do *T. gondii*.

Cepas	Grupos	Necrose*	Nódulo Glial **	Infiltrado Perivascular**
D8+EGS	V	0/1	0	0
D8+CH3	X	0/2	0,66±1,63	1±2,44
D8+N	Y	NR	NR	NR
D8	Z	0/2	1,5±2,12	2±2,82

* Número de camundongos com necrose sobre o total de camundongos estudados.

** Número médio de nódulos gliais ou infiltrados inflamatórios perivasculares em uma área total de $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$.

NR – Não realizado pois não houve sobreviventes após o desafio

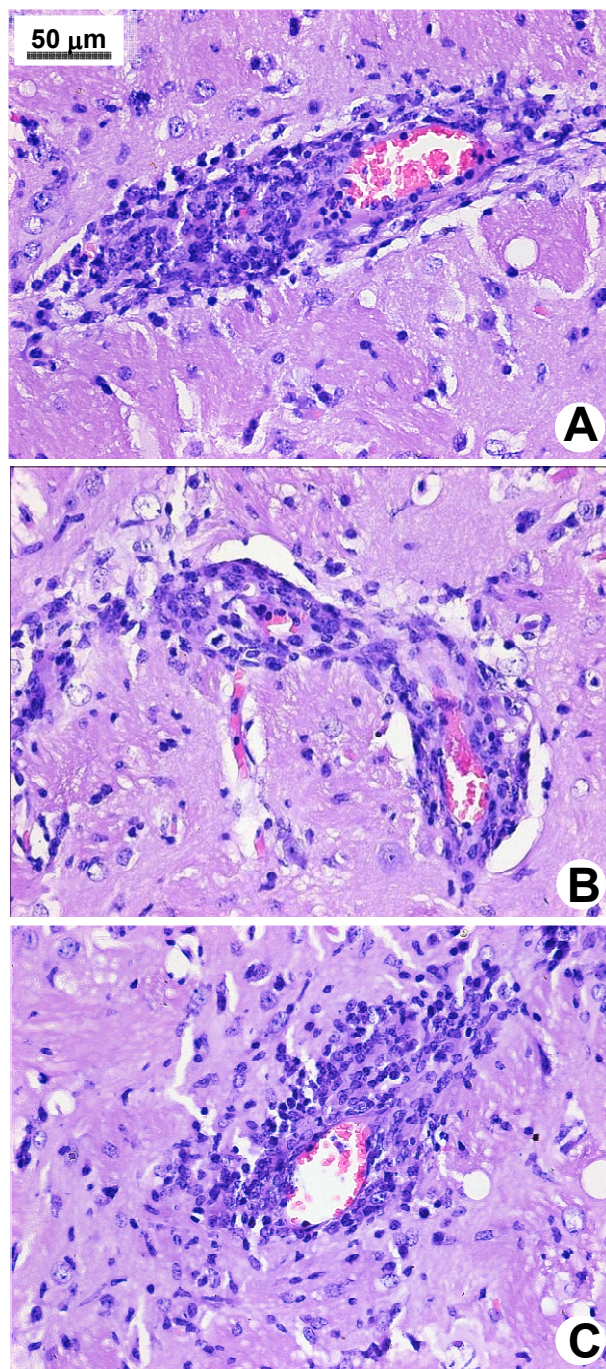


FIGURA 13 – Corte histológico mostrando infiltrado inflamatório perivascular no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 (C) e desafiados aos 45 dias da primo infecção com as cepas EGS (A) e CH3 (B) do *T. gondii*: não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos. Hematoxilina eosina.

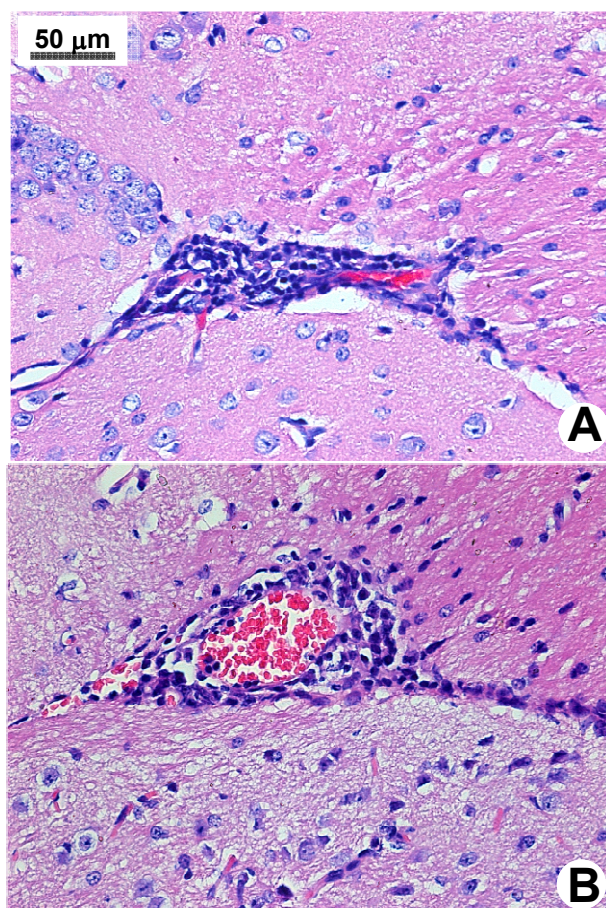


FIGURA 14 – Corte histológico mostrando infiltrado inflamatório perivascular no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa D8 (**B**) e desafiados aos 180 dias da primo infecção com a cepa CH3 (**A**) do *Toxoplasma gondii*: não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos. Hematoxilina eosina.

6 – DISCUSSÃO

A infecção de camundongos com as cepas virulentas de *T. gondii* EGS, CH3 ou N difere significativamente da infecção com a cepa não virulenta D8. A virulência do *T. gondii* é geralmente determinada de acordo com o transcorrer da infecção em camundongos. Cepas virulentas são aquelas em que a dose letal de 100% (LD_{100}) ocorre na presença de um único parasito viável. Já as cepas não virulentas possuem uma $LD \geq 1000$ taquizoítos e tipicamente produzem infecções crônicas assintomáticas (HOWE *et al.*, 1996). Em trabalho realizado por Ferreira e colaboradores (2001), a virulência das cepas N e EGS foi avaliada pelo acompanhamento da mortalidade em camundongos BALB/c inoculados com 10^3 , 10^2 , 10^1 ou 10^0 taquizoítos. A cepa N foi classificada como virulenta, pois foi observado 100% de mortalidade em camundongos BALB/c. Semelhante à cepa RH, a cepa N não é capaz de formar cistos. A cepa EGS apesar de virulenta causando 100% de mortalidade é capaz de formar cistos no cérebro dos animais. Além disso, o tempo que transcorreu entre o inóculo e a morte dos animais foi maior que o tempo observado para cepa N. A cepa CH3 é virulenta para camundongos BALB/c pois ocorreu 100% de mortalidade quando inoculados com 10^3 , 10^2 , 10^1 taquizoítos. Quando os camundongos foram inoculados com um único taquizoíto, 40% dos animais morreram. A cepa D8 é classificada como não virulenta semelhante à cepa ME49, pois 100% dos camundongos inoculados via intraperitoneal com 10^3 , 10^2 , 10^1 ou 10^0 taquizoítos sobreviveram aos 30 dias de experimento (BRANDÃO *et al.*, 2006).

Quando camundongos BALB/c foram primo infectados com a cepa D8 e desafiados após 45 ou 180 dias com as cepas EGS, CH3 ou N, a taxa de mortalidade foi significativamente diminuída em comparação aos animais controle primo infectados com EGS, CH3 e N, provavelmente como consequência da resposta imune adaptativa conferida pela cepa D8. Entretanto esta imunidade protetora é menos eficiente em camundongos em fase crônica avançada, 180 dias após a primo infecção com a cepa D8. Neste caso, ocorreu um aumento significativo no número de cistos cerebrais após a reinfecção com a cepa EGS sugerindo a coexistência de cistos das duas cepas em um mesmo animal. Esta coexistência foi confirmada pela ausência de sobreviventes após o bioensaio com estes cistos. A morte destes animais provavelmente ocorreu devido à presença de pelo menos um cisto da cepa EGS, pois os animais inoculados com 20 cistos da cepa D8 apresentam 100% de sobrevivência e animais inoculados com um cisto da cepa EGS não sobrevivem. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Dzitko e colaboradores (2006). Estes autores observaram que camundongos desafiados com uma dose letal de uma cepa virulenta após a primo infecção desenvolveram

uma forte resposta imune adaptativa capaz de impedir a morte do hospedeiro, mas não de impedir a reinfecção. A mortalidade dos animais desafiados com a cepa N (60%) também mostra a perda parcial da imunidade protetora após 180 dias da primo infecção. Os camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 ou 180 dias com as cepas EGS e CH3 também apresentaram uma diminuição da mortalidade em comparação aos animais controle primo infectados com EGS e CH3. Conforme observado em camundongos BALB/c esta diminuição da mortalidade foi menos pronunciada em fase crônica avançada, 180 dias após a primo infecção com a cepa D8. Em camundongos BALB/c a redução da mortalidade foi mais expressiva que em camundongos C57BL/6 desafiados aos 45 ou aos 180 dias da primo infecção. Camundongos C57BL/6 primo infectados com a cepa D8 e desafiados aos 45 ou aos 180 dias com a cepa N não apresentaram diminuição da taxa de mortalidade (100%). Entretanto, o tempo de sobrevivência dos animais aumentou de sete dias na primo infecção com a cepa N para 15 dias no desafio com a cepa N após 45 dias de infecção com a cepa D8. Estes dados sugerem que apesar da resposta imune adaptativa conferida pela cepa D8 fornecer alguma proteção esta não foi tão eficiente em camundongos C57BL/6 quando comparado a BALB/c. A coexistência de duas cepas de *T. gondii* no cérebro de camundongos após reinfecção experimental já foi demonstrada por Dao e colaboradores (2001). Estes autores observaram que infecção primária com a cepa Pru β gal de *T. gondii*, que expressa o gene β -galactosidase de *Escherichia coli*, não impede a formação de cistos teciduais após reinfecção com a cepa Ned de *T. gondii*, que pertence a outro genótipo. Dao e colaboradores (2001) também observaram em seu trabalho que num grupo de camundongos não isogênicos, desafiados com a mesma cepa, alguns animais se reinfecavam e outros não. Estes autores propuseram que a explicação para alguns animais não se reinfecarem estaria nas diferenças genéticas entre estes animais e sugeriram a realização de experimentos utilizando camundongos isogênicos. Em nosso trabalho os camundongos utilizados foram isogênicos, eliminando desta forma as diferenças genéticas individuais entre animais de uma mesma linhagem. Entretanto, mesmo com a eliminação das variáveis individuais de hospedeiros não isogênicos, alguns animais da mesma linhagem e desafiados com uma mesma cepa se reinfecaram enquanto outros não. A taxa de reinfecção dentro de um mesmo grupo variou também em função da cepa utilizada no desafio e com o tempo transcorrido após a primo infecção. Portanto, outros fatores individuais além da variação genética entre animais de uma mesma linhagem devem estar envolvidos na proteção contra a reinfecção.

Como discutido anteriormente, o primeiro critério para se determinar a ocorrência de reinfecção no presente trabalho foi mortalidade, seguido do bioensaio a partir de tecido cerebral dos camundongos sobreviventes após o desafio. Consideramos neste trabalho que a ocorrência de parasitos da segunda cepa, usada para a reinfecção, no cérebro do animal desafiado, é evidência do sucesso da reinfecção. Por outro lado não podemos descartar a possibilidade de que a reinfecção possa ter ocorrido sem que a segunda cepa tenha atingido o cérebro. Como todas as cepas usadas neste estudo (exceto a cepa N) formam cistos cerebrais em abundância, esta última possibilidade é pouco provável.

A coexistência das cepas D8 e EGS assim como das cepas D8 e N foi confirmada pela PCR-RFLP no cérebro de camundongos BALB/c desafiados aos 45 dias da primo infecção. Estes resultados confirmam a ocorrência de reinfecção com as cepas EGS e N. Por outro lado, não foi verificada a coexistência das cepas D8 e CH3 no cérebro dos animais sobreviventes. Vale ressaltar ainda que não existem trabalhos onde a hipótese de reinfecção foi testada com cepas recombinantes do *T. gondii*, como as cepas utilizadas neste trabalho. Ferreira e colaboradores (2006) analisaram oito loci independentes para *T. gondii* por PCR-RFLP e classificaram as cepas D8, EGS, CH3 e N como cepas recombinantes tipo I-III. A análise da cepa D8 diferiu da cepa CH3 somente quando foi utilizado o marcador *cS10-A6* enquanto que D8 diferiu da cepa EGS em quatro marcadores (*SAG2*, *GRA6*, *cS10-A6* e *CB21-4*) e da cepa N em cinco marcadores (*SAG2*, *GRA6*, *L363*, *cS10-A6* e *CB21-4*). Apesar de todas as cepas usadas no estudo serem recombinantes tipos I-III, a cepa CH3 possui maior número de alelos semelhantes à cepa D8 que as cepas EGS e N. Portanto, no presente trabalho a reinfecção não ocorreu entre cepas de genótipo semelhantes (D8 e CH3) quando os animais BALB/c foram desafiados 45 dias após a primo infecção, mas ocorreu quando foram utilizadas cepas com genótipos pouco semelhantes, como EGS e N. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Araújo e colaboradores (1997) que demonstraram a ocorrência de reinfecção usando cepas de genótipo diferentes. Entretanto, estes autores utilizaram cepas clonais, isto é, pertencentes a um dos três tipos genéticos clássicos descritos na literatura como predominantes na Europa e na América do Norte. A hipótese de que a reinfecção ocorre somente entre cepas de genótipo diferentes foi proposta por Dao e colaboradores (2001). Estes autores observaram que a reinfecção não ocorreu entre cepas de mesmo genótipo (tipo II), mas ocorreu entre cepas de genótipo diferente (tipo I e tipo III). Ao contrário desta hipótese, Freyre e colaboradores (2004) afirmaram que não há relação entre proteção e genótipo das cepas utilizadas no desafio. Estes autores observaram que a cepa BK (tipo I)

confere proteção contra algumas cepas tipo II (cepas C, Prugnaud e ME49) e não contra outras cepas tipo II (cepas Elg, Bear e M3).

Em camundongos desafiados aos 180 dias da primo infecção foi evidenciada a coexistência das cepas D8 e EGS, pela técnica de PCR-RFLP, em todos os camundongos BALB/c sobreviventes. A coexistência das cepas D8 e CH3 foi confirmada em 66,7% dos sobreviventes. Estes resultados confirmam a ocorrência da reinfecção com as cepas EGS e CH3. A ocorrência de reinfecção com a cepa N foi evidenciada por uma taxa de mortalidade de 60% nos animais desafiados. Durante a realização do bioensaio um animal do grupo D8+N morreu, mas sua reinfecção não foi confirmada pela PCR-RFLP. Talvez o baixo parasitismo pela cepa N no cérebro do animal foi responsável pela infecção no bioensaio, uma vez que um único parasito da cepa N aderido a mucosa do tubo digestivo antes de chegar ao estômago e infectando o animal seria capaz de matá-lo, pois a cepa N é virulenta, semelhante a cepa RH. Entretanto, um único parasito seria insuficiente para ser detectado pela PCR. De forma interessante, a cepa CH3 que não reinfetou os animais primo infectados com D8 desafiados aos 45 dias foi capaz de reinfetar 66,7% dos animais desafiados após 180 dias de infecção com a cepa D8.

Nos camundongos C57BL/6 desafiados aos 45 e 180 dias foi observado que 100% dos animais apresentaram coexistência das cepas D8 e EGS. A coexistência das cepas D8 e CH3 também foi de 100%. Estes dados confirmam a reinfecção com as cepas EGS e CH3. A ocorrência de reinfecção com a cepa N foi confirmada por uma taxa de 100% de mortalidade após o desafio com esta cepa aos 45 e 180 dias da primo infecção. É importante ressaltar que a cepa CH3 reinfetou camundongos C57BL/6 desafiados tanto aos 45 dias quanto aos 180 dias da primo infecção e não reinfetou camundongos BALB/c desafiados aos 45 dias da primo infecção. Os resultados observados nestas linhagens de camundongos sugerem que o genótipo das cepas não é o único fator determinante na ocorrência de reinfecção e que, portanto, a proteção imune não é estritamente genótipo específico.

Suzuki e colaboradores (2000) observaram que camundongos BALB/c infectados via oral com 20 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* apresentavam 100% de sobrevivência enquanto camundongos C57BL/6 apresentavam 20% de mortalidade. Liesenfield (2002) também observaram que camundongos C57BL/6 são mais susceptíveis a infecção com *T. gondii* que camundongos BALB/c. Estes autores infectaram os animais com 100 cistos da cepa ME49 e observaram 100% de mortalidade em camundongos C57BL/6 e 100% de sobrevivência em BALB/c. Em 2003, Fux e colaboradores propuseram que além da linhagem do camundongo o

genótipo da cepa também influencia na resistência ou susceptibilidade ao *T. gondii*. Estes autores observaram que a cepa ME49 exibe alta virulência em camundongos C57BL/6 e baixa virulência em BALB/c. Já a cepa P-BR, recombinante tipo I-III, apresenta baixa virulência tanto em camundongos BALB/c quanto em camundongos C57BL/6.

Por meio da técnica de “western blotting”, nenhum camundongo BALB/c reconheceu antígenos diferentes após o desafio com as cepas EGS, CH3 ou N aos 45 ou aos 180 dias da primo infecção com a cepa D8. Todos os camundongos C57BL/6 sobreviventes desafiados com EGS aos 45 dias da primo infecção e com EGS e CH3 aos 180 dias apresentaram pelo menos um anticorpo neosintetizado capaz de reconhecer antígeno não identificado (ou fracamente identificado) antes do desafio. Quatro de seis animais desafiados aos 45 dias com a cepa CH3 apresentaram anticorpos neosintetizados. Estes resultados observados para camundongos C57BL/6 também são sugestivos de reinfecção. Entretanto o “western blotting” deve ser utilizado com cautela como parâmetro de reinfecção, pois os resultados variaram em função da cepa utilizada e principalmente em função da linhagem de camundongo. Estes resultados são parcialmente discordantes daqueles apresentados por Dzitko e colaboradores (2006) que demonstraram que o “western blotting” combinado com ELISA (IgG e IgM) é um método de diagnóstico que pode ser usado para monitorar reinfecção experimental em camundongos e, possivelmente, em humanos.

A produção de IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) e também a produção de IgM no dia 30 após o desafio em relação ao dia 0 não forneceu evidências de ocorrência de reinfecção tanto em camundongos BALB/c quanto em camundongos C57BL/6. Por outro lado, foi observado um aumento significativo de produção de IgA no dia 30 em relação ao dia 0 em todos os grupos de animais BALB/c desafiados aos 45 e 180 dias da primo infecção o que não ocorreu no grupo controle infectado somente com a cepa D8. Estes resultados são semelhantes ao observado por Hassan e colaboradores (1999). Segundo estes autores houve um aumento significativo de IgA em ratos após a reinfecção. Em camundongos C57BL/6 somente o grupo de animais desafiados com a cepa EGS aos 45 dias da primo infecção apresentou aumento significativo na produção de IgA. Desta forma, IgA deve ser utilizada com cautela como marcador de reinfecção quando se utiliza a presença de parasito no cérebro como critério de reinfecção. Isto porque em camundongos BALB/c desafiados aos 45 dias com a cepa CH3, que não se reinfectaram, também foi observado um aumento desta imunoglobulina. Este fato pode ter ocorrido porque a produção de IgA é rapidamente estimulada através da resposta de mucosa intestinal que pode ser válida no controle da

infecção por *T. gondii* via oral (DECOSTER, 1996). Além disso, segundo Denkers & Gazzinelli (1998) IgA pode ser importante para se evitar a reinfecção com *T. gondii*. Portanto, a cepa CH3 pode ter invadido a mucosa intestinal estimulando a neossíntese de IgA. Entretanto, a resposta imune do hospedeiro pode ter sido suficiente para eliminar o parasito impedindo a invasão do cérebro, que é, neste trabalho, o critério de reinfecção.

Entre as citocinas envolvidas na resposta imune ao *T. gondii*, optou-se por estudar o INF- γ e IL-10 por representarem aquelas com maior capacidade reguladora da resposta imune adaptativa na toxoplasmose. O INF- γ é crucial como mediador da imunidade adaptativa (MA *et al.*, 1996), enquanto IL-10 atua na regulação da resposta pro inflamatória (LANG *et al.*, 2007). Segundo O'Garra & Vieira (2007) os níveis relativos de INF- γ e IL-10 produzidos por células T são cruciais para se determinar a eliminação do patógeno com mínima patologia ou instalação de uma infecção persistente. A quantidade de INF- γ produzida por esplenócitos de camundongos BALB/c, 45 dias após a infecção com a cepa D8, não foi diferente da quantidade de INF- γ produzida por camundongos BALB/c após 180 dias de infecção com a mesma cepa. Já a quantidade de IL-10 produzida pelos camundongos BALB/c aos 180 dias da infecção primária foi significativamente maior que a quantidade produzida aos 45 dias. Segundo Wilson e colaboradores (2005) a IL-10 desempenha importante função no balanço entre imunidade protetora e desenvolvimento de patologia imune na toxoplasmose. Camundongos deficientes desta citocina desenvolvem uma resposta inflamatória aguda letal. Estes autores também demonstraram que na fase crônica da toxoplasmose camundongos deficientes de IL-10 mostram inflamação intensa e sobrevivem menos tempo que os camundongos controle. Segundo estes autores a principal função de IL-10 na toxoplasmose é prevenir uma imunopatologia mediada por células T no cérebro de camundongos em fase crônica da toxoplasmose. Desta forma, IL-10 promove o equilíbrio da resposta imune permitindo que os parasitos sejam eliminados por ação da resposta imune protetora (relacionada à INF- γ) e ao mesmo tempo modulando a resposta inflamatória para impedir o desenvolvimento de lesões teciduais que possam levar o animal à morte. Entretanto, em nosso trabalho a maior produção de IL-10 em camundongos BALB/c após 180 dias de infecção com a cepa D8 foi provavelmente um dos fatores que favoreceram a maior mortalidade observada após o desafio com as cepas EGS, CH3 e N. A citocina IL-10, apesar de favorecer a sobrevivência do hospedeiro infectado com *T. gondii* durante uma infecção primária, poderia contribuir para ocorrência de reinfecção e maior mortalidade num evento de desafio subsequente. Isto ocorreria, provavelmente, porque IL-10 atua de forma a inibir eventos

iniciais de inflamação que são cruciais na proteção do hospedeiro durante a infecção com *T. gondii*. Estes eventos em que IL-10 atua envolvem a inibição da ativação de macrófagos limitando sua habilidade em matar organismos intracelulares, inibição da síntese de INF- γ e prevenção da diferenciação de clones Th1 por inibir a síntese de IL-12 pelos macrófagos (D'ANDRÉA *et al.*, 1993). Portanto, a maior quantidade de IL-10 em camundongos BALB/c aos 180 dias da primo infecção com a cepa D8 pode ter contribuído para a reinfecção destes animais com a cepa CH3 e também no aumento da taxa de reinfecção com a cepa EGS. A avaliação da inflamação no cérebro de camundongos BALB/c sustenta a hipótese de que IL-10 esteja envolvida na maior susceptibilidade observada nos animais desafiados aos 180 dias da primo infecção por inibir os eventos iniciais de inflamação. Animais desafiados com as cepas EGS, CH3 e N, 45 dias após a primo infecção, apresentaram um aumento de inflamação no cérebro que não foi observado nos animais infectados somente com a cepa D8. Quando foram desafiados 180 dias após a primo infecção com a cepa D8, não houve diferença na inflamação para os mesmos grupos de animais avaliados. Além disso, de forma geral, camundongos BALB/c desafiados aos 45 dias da primo infecção apresentaram uma inflamação mais exacerbada que os animais desafiados aos 180 dias. Ressalta-se o fato de que a inflamação observada em todos os animais foi discreta. A utilização de outras cepas de *T. gondii* evidencia grau variado de inflamação. Djurkovic-Djakovic e colaboradores (2006), observaram encefalite severa após 56 dias de infecção com as cepas ME49 e B6D, ambas pertencentes ao tipo II.

Em camundongos C57BL/6 a quantidade de INF- γ produzida aos 45 e 180 dias da primo infecção com a cepa D8 não foi significativamente diferente. Entretanto, quando comparados aos camundongos BALB/c aos 45 dias e 180 dias da primo infecção com a cepa D8, os esplenócitos de camundongos C57BL/6 produziram quantidades significativamente menores de INF- γ . Provavelmente, a menor quantidade de INF- γ em camundongos C57BL/6 favoreceu a maior taxa de reinfecção e a maior mortalidade observada nestes animais em relação aos camundongos BALB/c. A ação protetora de INF- γ envolve a redução ou eliminação do parasito pelos macrófagos, células dendríticas e enterócitos (BUZONI-GATEL & WERTS, 2006). Além disso, segundo Suzuki colaboradores (1988), durante a fase efetora da resposta imune, IFN- γ é a principal citocina envolvida no controle da infecção com *T. gondii*. A inflamação observada no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com D8 foi mais exacerbada que em camundongos BALB/c. A presença desta inflamação mais exacerbada em C57BL/6 não condiz com a menor quantidade de INF- γ observada nestes

animais indicando que outros mecanismos podem estar envolvidos nesta regulação como, por exemplo, a citocina IL-10 que não foi observada em níveis significativos nestes animais.

Os níveis de INF- γ e IL-10 dosados em camundongos BALB/c em nosso experimento após 45 dias de infecção com a cepa D8 foram semelhantes aos níveis observados por Jankovic e colaboradores (2007) para infecção experimental com 20 cistos da cepa ME49. É interessante destacar que no trabalho de Jankovic e colaboradores (2007) os níveis de IL-10 foram avaliados 2, 4, 6, 8, e 10 semanas após a infecção e apresentam uma tendência constante de aumento. Esta tendência de aumento observada por estes autores é condizente com o fato de que, em nosso trabalho, os níveis de IL-10 foram significativamente maiores aos 180 dias de infecção que aos 45 dias.

A dosagem de IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) e de IgM e IgA também foi realizada comparativamente em camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 45 e 180 dias da primo infecção com a cepa D8. Foi observado um aumento significativo de IgA e IgG1 em camundongos BALB/c primo infectados aos 180 dias com a cepa D8 quando comparado aos animais com 45 dias de infecção com a mesma cepa. Segundo Correa e colaboradores (2007) a produção de IgA em camundongos é estimulada pela presença das citocinas IL-10 e TGF- β enquanto IgG1 é um marcador de fase crônica e sua produção é estimulada principalmente por IL-4 que está relacionada a uma resposta Th2. Portanto, levantamos a hipótese de que a maior produção de IgA observada nos camundongos BALB/c com 180 dias de infecção pode estar relacionado ao aumento da produção de IL-10 evidenciado nestes animais. A observação de que camundongos BALB/c infectados a 180 dias com a cepa D8 são mais susceptíveis a uma reinfecção subsequente com o *T. gondii* que os camundongos BALB/c infectados a 45 dias pode também ser explicada pela presença de maior produção de IgG1 nestes animais. Isso ocorreria pelo fato de IgG1 estar relacionada a uma resposta tipo Th2 que é promovida pela produção de IL-4. A citocina IL-4 tem uma ação antiinflamatória inibindo a diferenciação de uma resposta Th1 e potencializando a ação de IL-10 (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Infelizmente não foi possível a dosagem de IL-4 nos camundongos analisados neste trabalho. IL-10 atua no controle da lesão associada a resposta inflamatória intensa inibindo vários tipos de doenças (O'GARRA, & VIEIRA, 2007). Estes resultados corroboram a hipótese de que uma resposta imune inflamatória menos exacerbada nos camundongos BALB/c desafiados aos 180 dias após a primo infecção com a cepa D8 estaria favorecendo maior mortalidade e maior taxa de reinfecção.

Em camundongos C57BL/6 foi observado aos 180 dias de infecção com a cepa D8 um aumento significativo na produção de IgG1 e IgG2a quando comparado aos animais infectados a 45 dias. De forma inesperada houve um aumento na produção de IgG2a, que é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que houve um aumento de IgG1, que é estimulada por citocinas anti-inflamatórias. Entretanto a quantidade de IgG1 foi significativamente maior que a quantidade de IgG2a, aos 45 dias após a primeira infecção, confirmando a hipótese descrita acima para camundongos BALB/c que se baseia numa resposta imune inflamatória ineficiente.

Além do tipo genético das cepas, dois fatores podem ser observados nestes experimentos e que claramente influenciam na ocorrência da reinfecção: tempo de infecção e a linhagem dos camundongos.

Aos 45 dias da primeira infecção com a cepa D8 os camundongos BALB/c apresentaram uma resposta imune adaptativa capaz de prevenir a mortalidade dos animais desafiados com uma dose letal de EGS, CH3 e N e impedir a reinfecção com a cepa CH3. Já aos 180 dias a resposta imune adaptativa do hospedeiro infectado com D8 não foi tão eficiente: a reinfecção ocorreu com as cepas EGS, CH3 e N e os animais desafiados com EGS, CH3 e N apresentaram 90%, 90% e 40% de sobrevivência, respectivamente. Estes resultados foram discordantes dos resultados apresentados por Dao e colaboradores (2001). Estes autores observaram que independente do tempo do desafio após a primeira infecção, a reinfecção não ocorreu entre cepas de mesmo genótipo.

Os camundongos BALB/c apresentaram aos 45 dias da primeira infecção com a cepa D8 uma resposta imune adaptativa que foi capaz de prevenir a reinfecção com a cepa CH3. Já os camundongos C57BL/6 desafiados com a cepa CH3 também aos 45 dias da primeira infecção com a cepa D8 não apresentaram uma resposta imune adaptativa eficiente capaz de impedir a reinfecção com a cepa CH3. Os resultados obtidos neste trabalho são condizentes com a observação de Freyre e colaboradores (2006) de que a proteção contra a reinfecção é relativa podendo ser influenciada por vários fatores, inclusive o genótipo do hospedeiro.

No presente trabalho foi testada pela primeira vez a hipótese de reinfecção utilizando cepas recombinantes como as comumente encontradas circulando entre animais e humanos no Brasil (FERREIRA *et al.*, 2006). A cepa D8, recombinante, foi capaz de induzir uma resposta imune protetora em camundongos reinfetados pelo *T. gondii* garantindo uma sobrevivência de até 100% apesar de não impedir a reinfecção. A ocorrência da reinfecção variou em função da cepa do parasito utilizada, em função do tempo após a primeira infecção em que foi realizado

o desafio e em função da linhagem de camundongo utilizada. Estas observações nos levam a concluir que a ocorrência da reinfecção está relacionada não só ao genótipo da cepa, mas também à resposta imune do hospedeiro que é dependente do tempo de infecção e da linhagem de camundongo utilizada. O ELISA e o Immunoblot não forneceram dados conclusivos da ocorrência de reinfecção. A avaliação da mortalidade e o bioensaio foram indicativos de reinfecção, mas a PCR-RFLP foi a técnica que permitiu confirmar a ocorrência de reinfecção.

7 – CONCLUSÕES

- 1) A primo infecção com uma cepa não virulenta de *T. gondii* induz uma resposta imune adaptativa capaz de reduzir a mortalidade de camundongos após o desafio com outras cepas virulentas do parasito.
 - 2) A reinfecção com cepas recombinantes de *T. gondii*, de forma geral, não altera a quantidade de cistos formados no cérebro dos camundongos.
 - 3) As chances da reinfecção ocorrer estão relacionadas com o tempo transcorrido entre a primo infecção e o desafio, em ambas as linhagens de camundongos utilizadas.
 - 4) Camundongos BALB/c e C57BL/6 são susceptíveis a reinfecção com diferentes cepas recombinantes de *T. gondii*, entretanto, a linhagem dos camundongos influencia na ocorrência de reinfecção. Camundongos C57BL/6 são mais susceptíveis à reinfecção que camundongos BALB/c.
 - 5) O genótipo das cepas de *T. gondii*, apesar de não ser o único fator envolvido, é determinante na ocorrência de reinfecção.
 - 6) A ocorrência de reinfecção pelo *T. gondii* está relacionada a um aumento de IgA plasmático, tanto em camundongos BALB/c como em camundongos C57BL/6.
 - 7) Em camundongos C57BL/6 o “western blotting” foi um bom marcador de ocorrência de reinfecção.
 - 8) A susceptibilidade de camundongos BALB/c à reinfecção com *T. gondii* se correlaciona com o aumento da produção de IgG1 e IgA plasmáticos.
 - 9) A susceptibilidade de camundongos BALB/c à reinfecção com *T. gondii* se correlaciona com o aumento da produção de IL-10.
 - 10) A maior susceptibilidade de camundongos a reinfecção com *T. gondii* desafiados 180 dias após a infecção primária está relacionada a uma tendência de resposta
-

antiinflamatória na fase crônica avançada da toxoplasmose murina experimental, em relação à toxoplasmose crônica recente (45 dias após a primo infecção).

- 11) As alterações histopatológicas observadas no cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram discretas e só forneceram dados conclusivos sobre a ocorrência de reinfeção quando analisada em conjunto com a produção de citocinas.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L. B.; HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, v. 144, p. 2725-2729, 1990.

AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. *An. Acad. Nac. Med.*, v. 155, p. 224-225, 1995.

APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii* the growth characteristics of three virulent strains. *Acta Trop.*, v. 65, p. 97-104, 1997.

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.

ASPINALL, T. V.; GUY, E. C.; ROBERTS, K. E.; JOYNSON, D. H. M.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. G. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int. J. Parasitol.*, v. 33, p. 97-103, 2003.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 9, n.1, p. 55-62, 2003.

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.

BLACWELL, J.; ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J. Influence of genes within the MHC on mortality and brain cyst development in mice infected with *Toxoplasma gondii*: kinetics of immune regulation in BALB H-2 congenic mice. *Parasite Immunol.*, v. 15, p. 317-324, 1993.

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.

BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; KOGA DA SILVA, E. M.; MACEDO, Z. S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. *J. Trop. Pediatr.*, v. 43, n. 2, p. 116, 1997.

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.

BROWN, C. R.; HUNTER, C.; ESTES, R.; BECKMANN, E.; FORMAN, J.; DAVID, C.; REMINGTON, J. S.; McLEOD, R. Definitive identification of s gene that confers resistance against toxoplasmosis. *Immunol.*, v. 85, p. 419-429, 1995.

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.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.*, v. 81, p. 111-122, 2002.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*, v. 73, n. 2, p.114-123, 1997.

CARRUTHERS, V. B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr. Bull.*, v. 33, n. 3, p. 745-751, 2007.

CARSON, W. E.; DIERKSHEIDE, J. E.; JABBOUR, S.; ANGHELINA, M.; BOUCHARD, P.; KU, G.; YU, G.; YU, H.; BAUMANN, H.; SHAH, M. H.; COOPER, M. A.; DURBIN, J.; CALIGIURI, M. A. Coadmistration of interleukin-18 and interleukin-12 induces a fatal inflammatory response in mice: critical role of natural killer cell interferon- γ production and STAT-mediated signal transduction. *Blood*, v. 96, n. 4, p. 1465-1473, 2000.

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.

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

COÊLHO, 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.

COMBE, C. L.; CURIEL, T. J.; MORETTO, M. M.; KHAN, I. A. NK cells help to induce CD8⁺-T cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4⁺ T cells. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 8, p. 4913-4921, 2005.

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.

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

DECOSTER, A. Detection of IgA anti-P30 (SAG1) antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 219, p. 199-207, 1996.

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.; BUTCHER, B. A.; BENNOUNA, S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int. J. Parasitol.*, v. 34, n. 3, p. 411-421, 2004.

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.

DE ROEVER-BONNET, H. Congenital toxoplasma infections in mice and hamsters infected with avirulent and virulent strains. *Trop. Geogr. Med.*, v. 21, p. 443-450, 1969.

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.

DOLLFUS, H.; DUREAU, P.; HENNEQUIN, C.; UTEZA, Y.; BRON, A.; DUFIER J. L. Congenital toxoplasma chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune women. *Br. J. Ophthalmol.*, v. 82, n. 12, p.1444-1445, 1998.

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 characterization 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, 2003a.

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 cat from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.*, v. 90, p. 721-726, 2004.

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

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.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; KLUN, I.; KHAN, A.; ALEKSANDRA NIKOLIC, A.; KNEZEVIC-USAJ, S.; BOBIC, B.; SIBLEY, DL. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect.*, v.8, p. 2206-2212, 2006.

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

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, n. 1, p. 99-104, 2001.

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

FEHNIGER, T. A.; SHAH, M. H.; TURNER, M. J.; VANDEUSEN, J. B.; WHITMAN, S. P.; COOPER, M. A.; SUZUKI, K.; WECHSER, M.; GOODSID, F.; CALIGIURI, M. A. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation

with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J. Immunol.*, v. 162, p. 4511-4520, 1999.

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.

FILISSETTI, 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.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, v. 167, p. 893-896, 1970.

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.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MÉNDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA, L.; GONZALEZ, M. *Toxoplasma gondii*: Partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. *Exp. Parasitol.*, v.112, p. 8-12. 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.

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 an 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.

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, 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.

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

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.

HUNTER, C. A.; SUZUKI, Y.; SUBAUSTE, C. S.; REMINGTON, J. S. Cells and cytokines in resistance to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 219, p.113-125, 1996.

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 (Stat)³ and Stat⁴. *J. Exp. Med.*, v. 181, p. 1755-1762, 1995.

JANKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; FENG, C. G.; GOLDSZMID, R. S.; COLLAZO, C. M.; WILSON, M.; WYNN, T. A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; SHER, A. Conventional T-bet⁺Foxp3⁻Th cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.*, v. 204, n. 2, p. 273-283, 2007.

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

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.

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.

LEMGRUBER, L.; SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron*, v. 39, p. 177-183, 2008.

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.

LIESENFELD, O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis.*, v. 185, n. 1, p. 96-101, 2002.

LIESENFELD, O.; KANG, H.; PARK, D.; NGUYEN, T. A.; PARKHE, C. V. WATANABE, S.; ABO, T.; SHER, A.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.*, v. 21, p. 365-376, 1999.

LÜTJEN, S.; SOLTEK, S.; VIRNA, S.; DECKERT, M.; SCHLÜTER, D. Organ- and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. *Infect. Immun.*, v. 74, n. 10, p. 5790-5801, 2006.

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.

McLEOD, R.; JOHNSON, J.; ESTES, R.; MACK, D. Immunogenetics in pathogenesis of and protection against toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 219, p.95-112, 1996.

MENZIES, F. M.; HENRIQUEZ, F. L.; ROBERTS, C. W. Immunological control of congenital toxoplasmosis in the murine model. *Immunol. Letters*, v. 115, p. 83-89, 2008.

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.

MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M.; SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 12, n. 2, p. 326 - 329, 2006.

MURRAY, H. W.; COHN, Z. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. *J. Exp. Med.*, v. 150, p. 938-949, 1979.

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

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Th1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 7, n. 6, p. 425-428, 2007.

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

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.

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.

SIBLEY, L. D.; MORDUE, D. G.; SU, C.; ROBBEN, P. M.; HOWE, D. K. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 357, p. 81-88, 2002.

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.

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

SU, C.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Idebtification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gpndii*. *Pnas*, 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.

SUZUKI, Y.; JOH, K.; ORELLANA, M. A.; CONLEY, F. K.; REMINGTON, J.S. A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. *Immunol.*, v. 74, p. 732-739, 1991.

SUZUKI, Y.; JOH, K.; YANG, Q.; CONLEY, F. K.; REMINGTON, J. S. MHC class I gene(s) in the D/L region but not the TNF- α gene determines development of toxoplasmic encephalitis. *J. Immunol.*, v. 153, p. 4649-4654, 1994.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon- γ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, v. 240, p. 516-518, 1988.

SUZUKI, Y.; SHER, A.; YAP, G.; PARK, D.; NEYER, L.E., LIESENFELD, O.; FORT, M.; KANG, H.; GUFWOLI, E. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, v. 164, n. 10, p. 5375-5382, 2000.

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S. J.; TANG, K.; BEATTY, W. L.; HAJJ, H. EL.; JEROME, M.; BEHNKE, M. S.; WHITE, M.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*, v. 314, p. 1776 - 1780, 2006.

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

VITOR, R. W. A.; FERREIRA, A. M.; FUX, B. Antibody response in goats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.*, v. 81, p. 259-263, 1999.

WELTER, A.; MINEO, J. R.; OLIVEIRA SILVA, D. A.; LOURENÇO, E. V.; VIEIRA FERRO, E. A.; ROQUE BARREIRA, M. C.; MARIA DA SILVA, N. BALB/c mice resistant to *Toxoplasma gondii* infection proved to be highly susceptible when previously infected with *Myocoptes musculus* fur mites. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 88, n. 5, p. 325-335, 2007.

WILSON, E. H.; WILLE-REECE, U.; DZIERSZINSKI, F.; HUNTER, C. A. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J. Neuroimmunol.*, v. 165, p. 63-74, 2005.

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
