

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS ESTÁGIOS AGUDO E CRÔNICO
NA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA PELA
TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO DIRETA MODIFICADA**

RODRIGO COSTA DA SILVA

BOTUCATU – SP

Julho 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS ESTÁGIOS AGUDO E CRÔNICO
NA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA PELA
TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO DIRETA MODIFICADA**

RODRIGO COSTA DA SILVA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

BOTUCATU – SP

Julho 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Silva, Rodrigo Costa da.

Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pela técnica de aglutinação direta modificada / Rodrigo Costa da Silva. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: Hélio Langoni

Assunto CAPES: 50502050

1. Toxoplasmose - Estudos experimentais 2. *Toxoplasma gondii*

CDD 636.0896936

Palavras-chave: Infecção experimental; MAT; *Rattus norvegicus*; Sorologia; *Toxoplasma gondii*

Autor: RODRIGO COSTA DA SILVA

Julho 2006

COMISSÃO EXAMINADORA:

- Prof. Dr. Helio Langoni: _____
- Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior: _____
- Prof. Dr. Antonio Carlos Paes: _____

*D*EDICATÓRIA

DEDICO

Aos meus sempre queridos e amados pais, Mauri Bargas da Silva e Neide Costa da Silva, cuja união fora abençoada por Deus há 32 anos, e que desta geraram dois frutos, criados com muito carinho, amor, dedicação, e muito orgulho. São exemplos de pessoas humildes e trabalhadoras, que muito me orgulho na vida. Educando com amor, carinho, sempre nos ensinando a nunca abaixar a cabeça perante uma dificuldade na vida, mas sim encontrar forças em nosso amor e união para seguir em frente. Ensinarão-me a buscar meus objetivos, confiando nos meus passos, sem o medo de desviar meu caminho. Pessoas batalhadoras que, entre alegrias e tristezas, superaram todas as dificuldades, mostrando a cada dia que passa que são pessoas abençoadas. Pessoas maravilhosas, importantes e fundamentais em toda minha formação, seja acadêmica, profissional e social, me permitindo chegar a mais uma conclusão de um pequeno passo. Mais um fruto que estão colhendo. Obrigado por todo amor e carinho.

EU AMO VOCÊS!

DEDICO,

Aos meus avôs paternos (in memoriam), Manoel Felipe da Silva e Alzira Barga da Silva, e maternos (in memoriam), Francisco Monteiro da Costa e Helena Jacob da Costa, que com muita dedicação, felicidade, amor e carinho, auxiliaram meus pais nos momentos de dificuldade sempre mantendo a união de nossa família, e permitindo que a esperança e a determinação nunca estivessem ausentes nas vidas de seus filhos e netos. Verdadeiras preciosidades em nossas vidas.

Fiquem com DEUS!

*A*GRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**, pelo dom da vida, e por permitir que a cada dia que me levanto, saúde tenha para desfrutar, felicidade e amor para disseminar e conhecimento para adquirir, e uma família maravilhosa para me orgulhar, amar e ser feliz.

Agradeço **as ratas e camundongas**, que concederam suas vidas para a ciência, permitindo a realização desta pesquisa.

Agradeço ao **Professor Assistente Doutor Antonio Carlos Paes**, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, e membro titular da comissão examinadora desta dissertação. Sempre amigo e profissional, possuidor de amplo conhecimento em doenças infecciosas animais, agradeço pelas conversas e experiência de vida compartilhada com assuntos sempre oportunos e conhecimento bem abrangente, além das oportunidades abertas profissionalmente e pela amizade construída desde a residência.

Agradeço ao **Professor Doutor Heitor Franco de Andrade Júnior**, chefe do Laboratório de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e membro titular da comissão examinadora desta dissertação, pela contribuição e experiência profissional compartilhada, estando sempre de prontidão para quaisquer dúvidas a serem sanadas, e por ter aberto as portas de seu laboratório para que uma das etapas do referido projeto de pesquisa fosse realizada.

Agradeço ao amigo e ao profissional **Professor Assistente Doutor Aristeu Vieira da Silva**, professor das disciplinas de Parasitologia e Enfermidades Parasitárias, da Universidade Paranaense, Campus de Umuarama, PR, e sempre amigo, que desde quando o conheci no estágio em 2001, mostrou ser uma pessoa dedicada, inteligente, exemplar e muito determinada. Sou muito agradecido não só por ter realizado a análise estatística, e também auxiliado na realização do referido projeto, mas sim pelo

amigo que é. Agradeço por todas as conversas, tenham sido elas do ponto de vista científico ou como aconselhamento. Muito obrigado.

Agradeço ao meu irmão, **Marcelo Costa da Silva**, que mesmo com nossas discussões, comuns entre irmãos, sempre me preocupei e amei. Junto aos meus pais, uma das pessoas que mais me orgulho, com imenso potencial profissional. Acreditamos muito em você e sempre estaremos ao seu lado, com muito amor no coração! Sou muito agradecido pela sua presença em minha vida, e pela torcida pelo meu sucesso.

Agradeço aos amigos **Dona Cidinha e Guilherme**, pessoas maravilhosas que sempre disseminaram muita alegria e felicidade. Muito obrigado!

Agradeço aos amigos **André Peres Barbosa de Castro, Sandia Bergamaschi Pezerico, Benedito Donizete Menozzi, Erica Maeme Tanaka, Júlia Plombon Pinheiro, Julyana Satie Carvalho Akaboshi, Mônica Vogl Sampaio, Veruska Maia da Costa, Juliano Leônidas Hoffmann, Patrícia Yoshida Faccioli e Luciana Bonato de Camargo**, pelo convívio diário durante o mestrado, sempre cultivado com muito conhecimento, amizade, e gratidão.

Agradeço ao amigo e sempre profissional, **Professor João Junqueira Fleury (in memorian)**, que em virtude do meu bom desempenho e interesse nas zoonoses, me indicou ainda na graduação o Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, que assim me identificaria com aquilo que gosto. A partir de estágio realizado mediante este contato o interesse pela residência, pesquisa diagnóstico em zoonoses, se tornou mais evidente. Por isso sou imensamente agradecido a esta pessoa maravilhosa que hoje descansa em paz ao lado de Nosso Senhor Jesus Cristo. Muito obrigado professor! Que DEUS o tenha!

Agradeço aos professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, pela convivência nas atividades de pesquisa realizadas durante o mestrado.

Agradeço ao pesquisador francês, **Doutor Philippe Thulliez**, pelo apoio fornecido na padronização do antígeno inativado com metanol, mediante

seu amplo conhecimento e experiência na confecção de antígenos inativados com acetona e metanol.

Agradeço aos funcionários **Wanderley Forlin, Sérgio Fávero, Fernando José Paganini Listoni e Rodrigo Costa Carreira, Dona Jeni, Dona Mércia e Dona Rita**, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, pela amizade construída.

Agradeço a minha melhor amiga **Tatiana Salerno**, que sempre esteve ao meu lado, com muita alegria, humildade e incentivo. Uma pessoa inteligente, compreensiva e muito esforçada. Uma amizade muito forte permitindo um fortalecer o outro nos momentos de fraqueza e tristeza. Agradeço pelos momentos agradáveis de descontração concedidos quando eu mais precisava de um ombro amigo. Agradeço muito pela sua amizade. Você é muito especial para mim, minha amiga. Que DEUS te abençoe!

Agradeço ao grande amigo **Fábio Hiroto Shimabukuro**, que desde meu primeiro estágio esteve sempre presente de modo a ajudar e acrescentar. Um amigo que me serviu de espelho principalmente na residência, pela sua capacidade de tomar decisões adequadas nos momentos certos, tomar atitudes mediante seus objetivos e pelo seu caráter investigativo, que o caracteriza como um excelente profissional e pesquisador. Além de ser uma pessoa que pude contar em todos os momentos, fossem eles de alegria ou tristeza. Um amigo que posso considerar como irmão. Muito obrigado por tudo, amigo!

Agradeço aos meus amigos da Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar e aqueles que freqüentam o Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, **Wellington Borges da Silva, Fábio Hiroto Shimabukuro, Carla Moraes, Tâmara Leite Cortez, Vanessa Riesz Salgado, André Peres Barbosa de Castro, Cassiano Victória, Acácia Orieth Elias, Tatiana Salerno, Vanessa Yuri de Lima, Daniele Bastos, Taíssa Cook, Amanda Keller, Karina Rasquel, Ana Paula Contente, Melissa Hartman, Taís Fukuta da Cruz, Audrey Rennó, Nair Lira, Roberto Ximenes Bolsanello, Simone, Janaína Biotto Cruz, Juliana Giantomassi Machado, Francisco (Chico)**,

Cristiane Nakada Nozaki, Veruska Maia da Costa, Carolina Ballarini Zetun, Marcella Zampolli Troncarelli, Walkiria Prado, Liliane Dantas, Jonas Lotufo Brant. Todos os momentos convvidos juntos foram inesquecíveis. Desde as festas até os eventos e organização dos mesmos. Grupo muito animado, cujas palavras para descrevê-los não existem. Pessoas especiais que permanecem em meu coração, os quais sempre poderão contar com a minha pessoa.

Agradeço aos amigos **Maria Anastácia Manzano, Maria Auxiliadora Manzano e Crispiniano Tetilla Manzano**, pessoas maravilhosas que sempre torceram pelo meu sucesso, dando muito apoio e energia positiva. Muito obrigado por todo o carinho.

Agradeço à minha prima querida, **Carolina Rodrigues Lincoln de Carvalho** por toda a força e torcida por mim. Uma pessoa que como eu está conquistando seu espaço no mundo científico, uma excelente profissional e uma pessoa maravilhosa. Tenho muito orgulho de ser seu primo.

Agradeço à minha prima, **Professora Doutora Marilene Bargas Rodrigues Alves**, docente da Faculdade de Odontologia, da Universidade Santa Cecília – UNISANTA, Santos, SP, que torceu desde minha graduação pelo meu sucesso profissional, e que sempre se preocupou com minha carreira científica acadêmica. Que DEUS abençoe-a e ao meu primo Manoel, seu esposo, e seus lindos filhos, Manoela e Murilo. Amo muito todos vocês!

Agradeço aos grandes amigos, **Carlos Augusto (Guto) e Juliana**, que foram meus grandes amigos contemporâneos da graduação, e que sempre torceram pelo meu sucesso, assim como eu pelo deles. Que a benção de DEUS conserve-os sempre felizes e unidos, pois vocês são pessoas maravilhosas e verdadeiros anjos.

Agradeço aos pós-graduandos, graduandos e funcionários, em especial da funcionária **Roselaine Pereira Alvim Cardoso**, do Laboratório de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, pela amizade e auxílio na realização da sorologia de ELISA por avidéz de IgG de ratos experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*.

Agradeço **aos funcionários do Biotério Central da UNESP**, pelo gentil atendimento, bom humor e boa vontade na disponibilização dos animais.

Agradeço à **Professora Doutora Hiro Goto**, do Laboratório de Soroepidemiologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por ter gentilmente cedido o conjugado anti-IgG de rato, para a realização das provas sorológicas de ELISA e ELISA por avidéz de IgG. Somos muito agradecidos

Agradeço às secretárias da Pós-Graduação, que mesmo sempre atarefadas, sempre ofereceram um pronto atendimento com muita gentileza e alegria cativante a todos.

Agradeço à **Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão de bolsa e reserva técnica ao referido projeto de pesquisa, registrado sob o número 03/08063-0.

Agradeço às secretárias do posto FAPESP localizado a Biblioteca Central da UNESP, Botucatu, SP, pelo pronto e gentil atendimento solicitado.

Agradeço à **todos os meus familiares**, que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso profissional, com muito carinho e amor.

Agradeço à **todos os meu amigos**, que sempre estiveram ao meu lado, onde quer que estivessem, torcendo e vibrando pelas minhas conquistas e novos desafios.

Aos demais, que por um fatídico lapso de memória não foram citados, peço desculpas, mas tenham a certeza da minha profunda gratidão.

AGRADecIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais, pessoas simples, humildes, e ricas de espírito, que sempre estiveram presentes em minha vida. Foram perfeitos educadores, permitindo seus filhos seguirem suas vidas com segurança, fazer escolhas adequadas e viver sempre com “os pés no chão”. Tenho muito orgulho destas duas dádivas que DEUS me concedeu, pois ensinaram a mim e meu irmão o que é lutar pelos nossos objetivos, construir uma família unida e proporcionar momentos de felicidade que jamais se extinguem em nossos corações. Permitira-nos ter educação adequada para nos destacarmos na sociedade. Apesar da distância física mantida a partir da graduação, o amor e a saudade sempre estiveram presentes. Sempre acreditando em mim, me permitindo concluir com muito orgulho mais esta etapa da vida.

Agradeço ao meu orientador, **Professor Titular Helio Langoni**, que desde quando cheguei a Botucatu, me recebeu de braços abertos em seus núcleos de pesquisa, e sempre foi uma pessoa brilhante profissionalmente, a quem nos moldamos, e um ser humano incomparável, um verdadeiro amigo. Sempre esteve presente, desde a época de estágio, residência e mestrado, de maneira única, e contribuindo enormemente para a formação de seus orientados, se preocupando com cada semente plantada sob sua tutoria, dando muitas vezes suporte quando da presença de problemas pessoais e/ou profissionais. Permitiu-me adquirir grande experiência não somente relativo à parte prática laboratorial, mas também a campo e a interação com a sociedade. Nos contribui cada vez mais com sua experiência na vida e profissional. Pessoa que, comparada aos meus pais, batalhou para construir sua vida, de modo que hoje todos se orgulham de sua presença junto a nossa comunidade. Sou imensamente agradecido pela oportunidade concedida e por acreditar no meu potencial.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
Quadro 1 – Protocolos utilizados para a produção de antígeno, inativado pela acetona (MAT-AA)	58
Quadro 2 – Doses de administração de dexametasona e hidrocortisona, calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica, de acordo com o método descrito por Pachaly & Brito (2001)	62

*L*ISTA DE *G*RÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁGINA
Gráfico 1 – Padronização da concentração de antígeno, conjugado anti-IgG de rato e avidina, para ELISA	78
Gráfico 2 – Variação semanal da concentração de anticorpos séricos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em ratas experimentalmente infectadas	82
Gráfico 3 – Comparação dos títulos, índices de avides pelo título de anticorpos (Avt) e de avides restrita (Avr) entre os grupos experimentais 1 e 2, e a cinética dos anticorpos durante o período experimental analisado	83
Gráfico 4 – Média \pm desvio-padrão da sobrevivência de camundongos inoculados com amostras de cérebro ou músculo, proveniente de ratas submetidas ou não ao protocolo de imunodepressão	94

*L*ISTA DE *F*IGURAS

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 – Ilustração das fases do lavado peritoneal analisadas.....	56
Figura 2 – Técnica de sedimentação espontânea, com análise dez minutos após a colheita do líquido peritoneal.....	71
Figura 3 – Técnica de sedimentação espontânea, com análise 25 minutos após a colheita do líquido peritoneal.....	72
Figura 4 – Técnica de sedimentação espontânea, com análise 60 minutos após a colheita do líquido peritoneal.....	73
Figura 5 – Avaliação macroscópica de amostras de soro submetidas a técnica de aglutinação direta modificada	74
Figura 6 – Avaliação macro e microscópica das reações positivas e negativas pela técnica de aglutinação direta modificada	74
Figura 7 – Características macroscópicas do antígeno inativado com acetona, ressuspendido em tampão borato pH 8,9, após homogeneização (7A). Permaneceu consistente e aderente (7B e 7C)	75
Figura 8 – Avaliação macroscópica dos sedimentos inativados pela acetona.....	76
Figura 9 – Tubo de centrífuga contendo o antígeno inativado com metanol. Fácil homogeneização, sem formação de grumos e gel.....	77
Figura 10 – Cisto tecidual encontrado no cérebro de ratas do grupo G1, após o período de 90 dias de infecção experimental pela cepa BTU10 (Microscópio JENAMED 2, objetiva de 40x).....	91

*L*ISTA DE *T*ABELAS

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AF x MAT-AM x RIFI-IgG), para o G1.....	81
Tabela 2 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AF x RIFI-IgG x RIFI-IgM), para o G1.....	81
Tabela 3 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AM x RIFI-IgG), para o G1.....	83
Tabela 4 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AF x MAT-AM x RIFI-IgG), para o G2.....	86
Tabela 5 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AF x RIFI-IgG x RIFI-IgM), para o G2.....	87
Tabela 6 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AM x RIFI-IgG), para o G2.....	87
Tabela 7 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos, em diferentes intervalos, nos animais submetidos ao protocolo de imunodepressão, segundo o método de detecção de anticorpos utilizado.....	88
Tabela 8 – Camundongas referentes a prova biológica do grupo G1-CIN das ratas infectadas não imunodeprimidas.....	90
Tabela 9 – Camundongas referentes a prova biológica do grupo G1-MIN das ratas infectadas não imunodeprimidas.....	90
Tabela 10 – Camundongas referentes a prova biológica do grupo G2-CIN das ratas infectadas e imunodeprimidas.....	92
Tabela 11 – Camundongas referentes a prova biológica do grupo G2-MIN das ratas infectadas e imunodeprimidas.....	93
Tabela 12 – Média \pm desvio-padrão da sobrevida de camundongos inoculados com amostras de cérebro ou músculo, proveniente de ratas submetidas ou não ao protocolo de imunodepressão.....	93
Tabela 13 – Listagem de reagentes utilizados.....	134

LISTA DE
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	-porcentagem	M	- molar
ELISA	-ensaio imunoenzimático	ml	- mililitros
H ₂ O ₂	-peróxido de hidrogênio	mm ³	- milímetros cúbicos
mm	-milímetros	SSA	- solução salina de antibióticos
RIFI	-reação de imunofluorescência indireta	<i>T.gondii</i>	- <i>Toxoplasma gondii</i>
MAT	-aglutinação direta modificada	P	- valor de P
DAT	-teste de aglutinação direta	W	- teste de Wilcoxon
LAT	-teste de aglutinação em látex	U	- teste de Mann-Whitney
AM	-antígeno inativado pelo metanol	PA	- puro para análise
AF	-antígeno inativado pela formalina	°C	- graus centígrados
AA	-antígeno inativado pela acetona	®	- marca registrada
pH	-potencial hidrogeniônico	SST	-solução salina tamponada de fosfatos
q.s.p.	-quantidade suficiente para	PBSTL	-phosphate buffered solution – tween – leite
U	-unidades internacionais	2ME	-2-mercaptoetanol
HIV	-vírus da imunodeficiência adquirida	OPD	-orto-fenilenodiamina
AIDS/SIDA	-síndrome da imunodeficiência adquirida	l	-litros
kDa	-kilodalton	TNF	-fator necrótico tumoral
HCl	-ácido clorídrico	IFN γ	-interferon gama
NaN ₃	-azida sódica	células NK	-células <i>natural killer</i>
DO	-densidade óptica	Th	-linfócitos T helper
g	-gramas ou força relativa à centrifugação, se relacionado à medida de rotação de centrifugação	nm	-nanômetros
IgM	-imunoglobulina M	Gy	-gray (dose de irradiação)
IgG	-imunoglobulina G	Cs	-elemento químico: céσιο
IgA	-imunoglobulina A	IL	-interleucina
IgE	-imunoglobulina E	Avt	-avidez pelo título de anticorpos
HI	-hemaglutinação indireta	Avr	-avidez restrita a diluição
SF	-teste de Sabin-Feldman	CIN	-cérebro “ <i>in natura</i> ”
G	-grupo experimental	CD	-cérebro digerido
μ l	-microlitros	MIN	-musculatura “ <i>in natura</i> ”
DPI	-dias após a inoculação	MD	-musculatura digerida
mg	-miligramas	ATCC	-coleção americana de cultura e tecido
		<i>N.caninum</i>	- <i>Neospora caninum</i>

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	PÁGINA
I INTRODUÇÃO	30
II REVISÃO DE LITERATURA	33
III OBJETIVOS	50
IV MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1. Animais de experimentação.....	53
4.2. Cepa de Sarcoma murino TG180	53
4.3. Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	54
4.4. Produção de antígeno.....	54
4.5. Inativação do antígeno.....	57
4.6. Grupos controles	60
4.7. Colheita de materiais	62
4.8. Provas sorológicas.....	63
4.9. Bioprova.....	67
4.10. Análise estatística	67
V RESULTADOS	69
5.1. Produção de antígeno.....	70
5.2. Inativação do antígeno.....	75
5.3. Padronização da concentração do extrato antigênico solúvel, do conjugado e da avidina para o ELISA	77
5.4. Provas sorológicas.....	79
5.5. Bioprova.....	89
VI DISCUSSÃO	95
6.1. Produção de antígeno.....	96
6.2. Inativação do antígeno.....	97
6.3. Provas sorológicas.....	99
6.4. Bioprova.....	106
VII CONCLUSÕES	110
VIII REFERÊNCIAS	113
APÊNDICES	126

RESUMO

RESUMO

SILVA, R.C. **Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pela técnica de aglutinação direta modificada.** Botucatu, 2006. 135p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo.

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita de grande importância no contexto de produção animal e saúde pública, envolvendo alterações fetais e abortos na espécie humana e em animais, sendo ainda importante patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos. A técnica de aglutinação direta modificada (MAT) destaca-se por independência da origem dos anticorpos e permitir diferenciar os estágios da infecção toxoplásmica. Assim, padronizou-se a técnica de sedimentação espontânea, verificando-se que com 60 minutos, a parte líquida da suspensão apresentava predominantemente taquizoítos e raras células pequenas. O antígeno inativado pelo metanol (AM) permitiu a exposição de antígenos de fase aguda somente, enquanto que a formalina (AF) expõe tanto os de fase aguda como crônica. Testou-se o antígeno para três grupos experimentais: G1, ratas infectadas com 10^4 bradizoítos da cepa BTU10, genótipo I, via oral; G2, ratas infectadas com 10^4 bradizoítos da cepa BTU10, via oral, e imunodeprimidas com corticóide; G3, grupo controle. A comparação das MATs permitiu a diferenciação dos anticorpos IgG de fase aguda, dos de fase crônica. Gradativamente foi obtida a maturação dos anticorpos, sendo observada pela avididade das mesmas no teste de ELISA. Os anticorpos do grupo experimental se comportaram semelhantemente para as provas sorológicas, até a 13ª semana. A reagudização no G2 foi detectada na bioprova da musculatura antes que no cérebro. Com isso, verificou-se que a MAT-AM e a MAT-AF permitem a diferenciação dos estágios agudo e crônico, e ainda a caracterização da reagudização da infecção em pacientes imunocomprometidos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; *Rattus norvegicus*; MAT; Sorologia; Infecção experimental

*A*bstract

ABSTRACT

SILVA, R.C. **Differentiation between acute and chronic stages in *Toxoplasma* infection by modified agglutination test.** Botucatu, 2006. 135p. Dissertation (Master) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Campus of Botucatu, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

Toxoplasma gondii is a parasite protozoan with great importance to animal production and public health, involving foetal alterations and abortions in human and animal species, being an important opportunistic pathogen in immunocompromised patients. Modified agglutination test (MAT) has great importance to independ of the origin of antibody, and to allow differentiating the periods of the *Toxoplasma* infection. Thus, the protocol of spontaneous sedimentation we standardized, verifying that with 60 minutes, the liquid part of the suspension showed predominantly the presence of tachyzoites and rare small cells. The antigen inactivated with methanol (AM) allowed the exposition of antigens of acute phase only, while formalin (AF) as much the acute as chronic phase. Antigen was tested to three experimental groups: G1, rats infected with 10^4 bradyzoites of BTU10 strain, genotype I, orally; G2, rats infected with 10^4 bradyzoites of BTU10 strain, orally, and immunodepressed with corticoid; G3, control group. The comparation of MATs allows the differentiation of IgG from acute phase of the ones from chronic phase. A gradual maturation of immunoglobulins was gotten, being observed through the avidity of the same ones, and surveyed for ELISA. The antibodies of the experimental groups showed similar profile for all serological tests, until the 13th week. Reacutization of the infection in G2 was detected earlier in bioassay of musculature than brain. Thus, we verified that MAT-AM and MAT-AF allow the differentiation of the acute and chronic stages, and still the characterization of the reacutization of the infection in immunocompromised patients.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; *Rattus norvegicus*; MAT; Serology; Experimental infection

*I*NTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário, distribuído amplamente pelo mundo, capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros. Parasita intracelular obrigatório, e pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae, ordem Eucoccidia, sendo a única espécie do gênero *Toxoplasma*. É o causador da toxoplasmose e pode infectar todos os animais homeotérmicos, inclusive o homem. O seu ciclo de vida é heteroxeno tendo como hospedeiros definitivos os gatos e outros felídeos e, como hospedeiros intermediários, os demais animais homeotérmicos, como os de produção. É o principal responsável por altos índices de abortos, principalmente em ovinos. Relativamente ao risco em saúde pública, tal infecção apresenta grande importância por causar abortos, na transmissão congênita, além de graves seqüelas em recém-nascidos, e acometer pacientes imunocomprometidos, principalmente pacientes HIV positivos (TENTER et al., 2000).

Por estas razões, a toxoplasmose é considerada uma das parasitoses de maior importância médica e veterinária, com necessidade do aprimoramento de técnicas diagnósticas de maior eficácia e precisão temporal da infecção (MEIRELES, 2005).

A grande maioria dos animais infectados por *T.gondii* resiste à infecção, tornando-se portadores, de modo que a toxoplasmose-infecção é muito difundida (CORRÊA & CORRÊA, 1992) e uma das mais comuns no homem, em todo o mundo (DUBEY et al., 1998; SÁFADI, 2000; TENTER et al., 2000). A toxoplasmose-doença é mais rara, apesar de sua distribuição mundial.

A infecção pelo *T.gondii* constitui uma das zoonoses mais difundidas no mundo. Em todos os países, grande parte da população humana e animal (mais de 300 espécies de animais entre mamíferos e aves – domésticos ou silvestres) apresentam parasitismo pelo *T.gondii*. Nos mais variados climas e condições sociais chega a apresentar uma percentagem de indivíduos positivos que varia de 20 a 83% (1 a 2 bilhões de pessoas) da população. Em algumas regiões, 40 a 70% de humanos adultos, aparentemente sãos, apresentam-se sorologicamente positivos para toxoplasmose. É do conhecimento dos especialistas que o número de pessoas com sorologia positiva para *T.gondii* é

enorme sendo, talvez, o protozoário mais difundido entre a população humana e animal, incluindo as aves e excetuando-se os animais de sangue frio, como os répteis (DUBEY et al., 1998; KAWAZOE, 2000). Nos Estados Unidos da América, pela análise dos dados de nove sistemas nacionais de notificação em saúde e dados publicados em periódicos especializados, estimam-se 1.500.000 infecções anuais, sendo cerca de 15% sintomáticas (MEAD et al., 1999).

Os objetivos deste trabalho foram padronizar um novo método para produção de antígeno, com a utilização de menor número de animais, e comparar a evolução de anticorpos em grupos experimentais, de ratas infectadas e imunodeprimidas ou não com corticóides, pelas técnicas sorológicas de aglutinação direta modificada, com antígenos inativados com reagentes diferentes, permitindo a diferenciação entre fase aguda e crônica da infecção, de imunofluorescência indireta para a detecção de IgM e IgG, e pelo ensaio imunoenzimático para a detecção de IgG e sua avidéz, bem como verificar se há interferência ou não dos corticóides na cinética dos anticorpos.

*R*EVISÃO DE *L*ITERATURA

II – REVISÃO DE LITERATURA

O *Toxoplasma gondii* foi descrito pela primeira vez, em 1908, por Nicolle e Manceaux, no Instituto Pasteur da Tunísia, ao norte da África, sendo encontrado no cérebro do roedor selvagem *Ctenodactylus gondii*. Neste mesmo ano, foi descrito em um coelho de laboratório por Splendore, em São Paulo, Brasil (SPLENDORE, 1908; NICOLLE & MANCEAUX, 1908). O nome do gênero é derivado de *toxon*, palavra grega que significa arco e se refere à forma que os taquizoítos apresentam *in vitro*, já o nome da espécie deriva do roedor *Ctenodactylus gondii*, onde o agente foi isolado pela primeira vez.

As primeiras implicações da doença humana datam de 1923, quando Janku observou cistos de *T.gondii* na retina de uma criança de 11 meses com hidrocefalia e microftalmia (JANKU, 1923). Dez anos mais tarde, foi descrita a doença congênita causada pelo *T.gondii* e, na década de 40, a infecção adquirida foi descrita em um paciente adulto, que faleceu de toxoplasmose disseminada. Entretanto, a freqüência da infecção humana só foi conhecida a partir de 1948, com a introdução do clássico teste do corante de Sabin & Feldman (SABIN & FELDMAN, 1948).

O *T.gondii* possui uma estrutura populacional altamente clonal apesar da capacidade de recombinação gênica no hospedeiro definitivo (HOWE & SIBLEY, 1995), que consiste predominantemente de três linhagens, designadas I, II e III, indicando que sua propagação na natureza ocorra principalmente pela replicação assexuada ou por cruzamentos uniparenterais. A propagação do parasita parece ocorrer primariamente pela reprodução clonal, com recombinação sexual entre as diferentes cepas do parasita ocorrendo somente nas populações naturais, e não freqüentemente (MONDRAGON et al., 1998; SWITAJ et al., 2005). A clonalidade foi evidenciada pelos isolamentos de cepas com genótipos idênticos de diferentes hospedeiros provenientes de áreas geográficas distintas. A divergência genômica entre as linhagens é de cerca de 1% (AJIOKA et al., 2001).

Com relação ao fenótipo de virulência para o camundongo, as diferentes cepas são classificadas em: altamente virulentas, quando um parasita é suficiente para matar o camundongo, pois se multiplicam rapidamente no hospedeiro e causam a infecção aguda; pouco virulenta,

quando promove infecção crônica em camundongo, sem a necessidade de utilização de tratamento específico; e de virulência intermediária, quando um parasita não é suficiente para matar o camundongo, mas a medicação do animal, com altas doses de sulfonamidas, é necessária para prevenir a morte (JOHNSON, 1997; FREYRE et al., 2001a). As cepas altamente virulentas são letais em doses pequenas, enquanto que as pouco virulentas ou intermediárias produzem infecções crônicas assintomáticas (BIÑAS & JOHNSON, 1998).

As cepas de *T.gondii* tipo I ocorrem predominantemente em casos de toxoplasmose humana congênita, enquanto que as cepas do tipo II são prevalentes em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida – AIDS (HOWE & SIBLEY, 1995; FUENTES et al., 2001). Honoré et al. (2000) propuseram que as cepas encontradas no homem são na maioria tipo II e que a prevalência dos genótipos das cepas encontradas em pacientes imunodeprimidos não parece diferir daquela observada nos casos de toxoplasmose congênita. Não está claro se a associação entre as cepas do tipo II com casos de toxoplasmose humana é devido a maior infecciosidade ou maior prevalência deste genótipo (MEAD et al., 1999; MONDRAGON et al., 1998)

As cepas tipo I são capazes de matar todos os camundongos inoculados com apenas um parasita, e as cepas de baixa virulência (tipos II e III) matam apenas com inóculo superior a 10^2 parasitas, e a infecção crônica é facilmente estabelecida no organismo do hospedeiro (HOWE et al., 1996; SEVÁ et al., 2006). Algumas cepas do tipo II produzem grande número de cistos durante a infecção crônica em camundongo e podem causar encefalite.

As cepas tipo II estão associadas a doença clínica humana, apresentando uma ocorrência maior em pacientes HIV positivos, com 65% dos casos. Sua forte associação com a doença humana em pacientes HIV positivos tem importante implicação no diagnóstico, tratamento e prevenção da toxoplasmose (HOWE & SIBLEY, 1995).

As cepas do tipo II e III levam à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos, enquanto as cepas do tipo I são extremamente virulentas para camundongos, causando níveis significativos de parasitemia, que pode aumentar o risco de transmissão transplacentária ou

severidade de infecção nos fetos em desenvolvimento (HOWE & SIBLEY, 1995).

O homem e os animais podem infectar-se pelas três formas do ciclo de vida: (1) via oral pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felídeos e infectantes após esporulação em um a cinco dias, (2) pela ingestão de cistos em tecidos de hospedeiros intermediários, e (3) via uterina pela transmissão transplacentária de taquizoítos. O *T.gondii* também pode ser transmitido em produtos sangüíneos, transplantes de órgãos, ou pela ingestão de taquizoítos, em leite caprino não pasteurizado (TENTER, 1999).

O taquizoíto (*takhys* = rápido), células em formato de arco com dimensões que variam de 4 a 8µm de comprimento por 2 a 4µm de diâmetro, é a forma encontrada durante a fase aguda da infecção, de multiplicação rápida, dentro de vacúolos citoplasmáticos (vacúolos parasitóforos) de várias células, como nas células do sistema fagocítico mononuclear, células hepáticas, pulmonares, nervosas, submucosas e musculares.

O bradizoíto (*bradys* = lento), forma de multiplicação lenta do parasita, é encontrado dentro do vacúolo parasitóforo de uma célula, cuja membrana forma a cápsula do cisto tecidual. Os cistos teciduais medem cerca de 50 a 200µm, contendo centenas de bradizoítos, e estão localizados predominantemente no sistema nervoso central, globo ocular, bem como nos músculos esquelético e cardíaco (JACOBS, 1967; DUBEY et al., 1998; KAWAZOE, 2000). Estes cistos são inativados após o congelamento a -20°C, ou aquecimento a +65°C, e sob radiação ionizante com doses de 50Gy de ¹³⁷Cs (DUBEY et al., 1986; KOTULA et al., 1991) constituindo assim, o congelamento e o cozimento completo da carne, algumas das formas de profilaxia da transmissão da toxoplasmose humana.

O oocisto é a forma de resistência que possui uma parede dupla bastante resistente às condições ambientais (TENTER et al., 2000). São produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes, e eliminados imaturos junto com as fezes (DUBEY et al., 1998; KAWAZOE, 2000). Pode permanecer por meses e até anos viável no ambiente em uma temperatura entre -20°C e +37°C (DUBEY & FRENKEL, 1972), desde que não exposto à luz solar direta e sob condições razoáveis de umidade relativa (AZEVEDO et al., 1983).

Os felídeos excretam oocistos de *T.gondii* nas fezes 3 a 10 dias após ingestão dos bradizoítos, ao redor de 18 dias após a ingestão dos oocistos esporulados, e de 13 dias após ingestão de taquizoítos. Menos de 30% dos felídeos que ingerem oocistos ou taquizoítos eliminam oocistos (DUBEY, 1998b).

As principais formas infectantes do *T.gondii*, envolvidas na transmissão do parasita, são o cisto tecidual contendo bradizoítos e o oocisto contendo esporozoítos. Após a ingestão, a parede externa do cisto ou oocisto é rompida por degradação de enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal, e os estágios infectantes (bradizoítos ou esporozoítos) são liberados no lúmen intestinal e se convertem em taquizoítos. A disseminação dos taquizoítos ocorre pelo rompimento de células infectadas, invasão de células adjacentes e pelo sangue. Estes podem infectar qualquer célula nucleada do organismo por penetração ativa, caracterizando a fase aguda da doença, e se estendendo por todo o corpo do hospedeiro. (WONG & REMINGTON, 1994).

A variação da prevalência parece ser devida a fatores climáticos, geográficos, hábitos alimentares, tipo de trabalho, etc., indicando que os mecanismos de transmissão devem ocorrer de várias formas do parasita. Oocistos em fezes de gato jovem infectado, cistos presentes em carnes crua ou mal cozidas, taquizoítos encontrados no leite, saliva, esperma, lambedura ou perdigotos ou, ainda, congenitamente (WARNEKULASURYIA et al., 1998; KAWAZOE, 2000).

Os gatos têm importância fundamental na toxoplasmose. Quando a doença ocorre em gatos jovens não imunes (primoinfecção), há produção de milhares de oocistos, eliminados nas fezes, caracterizando o estágio enteroepitelial. Tanto os gatos domésticos como os selvagens (ocelotes, jaguar, jaguatirica, etc.) são os únicos animais nos quais o parasita pode realizar o ciclo sexuado, eliminando após a primoinfecção milhares de oocistos imaturos pelas fezes. Além disso, o carnivorismo e a disseminação de oocistos por insetos, minhocas, etc., interferem na ampla distribuição desse protozoário (DUBEY et al., 1998; KAWAZOE, 2000).

A toxoplasmose humana é na maioria das vezes benigna e assintomática em 60% dos casos (SAWADOGO et al., 2005). Entre 15 e 85% da população humana adulta é cronicamente infectada com *T.gondii*,

dependendo da localização geográfica (DUBEY & BEATTIE, 1988). Nos Estados Unidos da América, estimam-se 1.500.000 infecções anuais, sendo cerca de 15% sintomáticas. Neste país, entre 1992 e 1996, a toxoplasmose foi a responsável por cerca de 5.000 hospitalizações, com pelo menos 2.500 casos de origem alimentar, representando 4,1% das internações causadas por infecções alimentares. Foram registrados 750 óbitos por toxoplasmose, com cerca de 50% de infecções adquiridas pelo consumo de alimentos contaminados, o que representa 20,7% das mortes associadas às infecções de origem alimentar, ficando abaixo somente da *Salmonella* (30,6%) e da *Listeria monocytogenes* (27,6%). Além disso, o desenvolvimento de casos crônicos de toxoplasmose, como naqueles indivíduos infectados pela via congênita, nos que desenvolvem coriorretinite e em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), é estimado em 4.700 a 12.100 casos anuais (MEAD et al., 1999).

Produtos alimentícios das aves provavelmente não são importantes na transmissão devido à quantidade de *T.gondii*, em frangos, ser baixa e a carne usualmente resfriada e/ou cozida antes do consumo. Por outro lado, a carne de animais selvagens pode ser uma fonte de infecção para *T.gondii*, tendo sido encontrados nos músculos de cervos, alces e ursos infectados naturalmente (ECKERT, 1996).

Estimativas indicam que 1/50 da população norte-americana sofre de algum grau de imunodeficiência, o que pode contribuir para uma maior susceptibilidade a doenças oportunistas. Nesta população incluem-se mulheres grávidas, pessoas com mais de 65 anos de idade, pacientes sob tratamento para câncer, transplantados e portadores do HIV (SMITH, 1997).

Modelos experimentais de toxoplasmose têm sido desenvolvidos em animais de laboratório para estudar variados aspectos desta enfermidade. Como observado em outras doenças parasitárias, a patologia da infecção pelo *T.gondii* resulta da interação entre fatores parasitários e do hospedeiro. Isto reforça as dificuldades em comparar os dados, algumas vezes discordantes, obtidos por diferentes laboratórios, uma vez que geralmente os modelos experimentais variam em muitos aspectos: a linhagem do animal, a via de infecção, a cepa de *T.gondii* utilizada, as condições de manutenção e o número de passagens do parasita (ZENNER et al., 1998).

Os ratos são considerados um dos hospedeiros mais resistentes ao *T.gondii* em relação à toxoplasmose clínica, sendo fatores de variação importantes no comportamento do parasita neste modelo experimental: a cepa utilizada, o estágio infectante e a via de inoculação utilizada (DUBEY & FRENKEL, 1998). Em geral, considera-se que a resistência desta espécie ao *T.gondii* está relacionada à idade do animal, sendo que os ratos neonatos seriam susceptíveis e os desmamados resistentes. Entretanto, utilizando a cepa RH de *T.gondii*, inoculada pela via intraperitoneal, De Champs et al. (1998) demonstraram diferença significativa na curva de sobrevivência apenas em relação ao número de parasitas inoculados e não em relação à idade, estabelecendo a dose letal como acima de 10^7 parasitas, havendo, entretanto, prejuízo no crescimento dos animais inoculados com doses menores que 10^7 parasitas.

Em camundongos esta cepa tem um comportamento sempre fatal (DUBEY, 1998c), diminuído moderadamente pela quimioprofilaxia. Portanto, como os ratos desenvolvem infecção crônica sem a necessidade de terapia, têm sido utilizados para manter o parasita (DUBEY & FRENKEL, 1998).

Com relação ao desenvolvimento do quadro clínico e a transmissão transplacentária, a toxoplasmose em humanos e ratos é similar, e a infecção em ratos pode servir como um modelo para a enfermidade humana, podendo trazer informações importantes quanto à patologia, tratamento e imunoprofilaxia (SMITH, 1997; DUBEY & FRENKEL, 1998).

Tanto nos pacientes com AIDS como nos transplantados, a toxoplasmose tem sido comum. Como os cistos do *T.gondii* persistem no organismo por um período prolongado, qualquer imunossupressão significativa pode ser seguida por uma recrudescência da toxoplasmose. O risco de doença aguda disseminada em pacientes HIV positivos com sorologia negativa para toxoplasmose é significativo e de difícil diagnóstico (MACRE, 2002).

Em transplantados, a toxoplasmose é freqüente devido à imunossupressão intensa a que os receptores de transplantes estão submetidos. A infecção decorre tanto pela reativação dos cistos pré-existentes no receptor, como pela infecção aguda causada pelos cistos presentes nos órgãos de doadores infectados (THOMAS & PELLOUX, 1993; BOTERREL et al., 2002).

Yamamoto et al. (2000), estudando a toxoplasmose congênita e adquirida, em 136 pacientes, verificaram que a proliferação, *in vitro*, das células mononucleares do sangue periférico, em resposta aos diferentes antígenos de toxoplasma entre o grupo com alterações adquiridas e o grupo com alterações congênitas, sugere duas diferentes formas de apresentações, diferenciadas por teste laboratorial. Alguns pacientes de cada grupo foram analisados para resposta de hipersensibilidade tardia cutânea frente aos antígenos de toxoplasma. Os pacientes com toxoplasmose ocular adquirida, apresentaram a reação de hipersensibilidade tardia cutânea mais intensa, enquanto os pacientes com alteração ocular congênita não apresentaram reação ao antígeno *in vivo*, entretanto, a diferença não foi significativa devido ao reduzido número de pacientes. Assim, sugere-se que a resposta imune aos diferentes antígenos parasitários depende do momento em que a infecção ocorre.

Estimativas recentes, baseadas em estudos sorológicos sugerem incidência de infecção pré-natal primária, durante a gravidez variando de 1-310/10.000 grávidas e, por outro lado, 1-120/10.000 nascimentos em diferentes populações da Europa, Ásia, Austrália e das Américas (TENTER et al., 2000).

A toxoplasmose pode ser dividida em duas fases: a aguda, onde o parasita se dissemina pelos tecidos do hospedeiro, e a fase crônica que se caracteriza pela presença de cistos em cérebro e musculatura de animais infectados. Em ratos, após a infecção intraperitoneal com 10^5 taquizoítos da cepa RH, os primeiros órgãos a se infectarem são baço, diafragma, pulmões, linfonodos mesentéricos e cérebro. No 16º dia pós-infecção apenas o cérebro continuou infectado. O pico para o número de parasitas foi observado para cada órgão, sendo encontrado no 2º dia no diafragma, entre o 2º e 4º dias no baço, 4º dia nos pulmões, e finalmente 11º dia nos linfonodos mesentéricos, enquanto que no cérebro e fígado apenas uma pequena quantidade foi detectada. A carga parasitária continua aumentando entre os 4º e 8º dias, em seguida decresce em quase todos os órgãos, exceto no cérebro, onde permanece estável (ZENNER et al., 1998).

O desenvolvimento da imunidade está associado com a interrupção da replicação de taquizoítos e a formação de cistos teciduais latentes contendo bradizoítos, o que caracteriza a fase crônica da infecção (JACOBS, 1967).

O intenso estímulo humoral, causado pela grande quantidade de antígenos, gera altos níveis de anticorpos específicos, inicialmente das classes IgM e IgG, mas de baixa avidéz que são substituídos por anticorpos IgG de alta afinidade com a evolução da infecção. A resposta imune celular também é rapidamente estabelecida, com intensa produção de interferon gama ($IFN\gamma$), que age tanto na ativação das células imunes como $CD8^+$, ou diretamente por alterações metabólicas nas células infectadas, quando há produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio (KASPER & KHAN, 1998). Toda essa resposta imune induz à elevação da temperatura corpórea, um sinal para a transformação em cistos (DUBEY et al., 1998).

As células T $CD8^+$ agem como efetoras, com ação citotóxica *in vivo* quando pela produção de $IFN\gamma$, sendo requeridas ao lado das células T $CD4^+$ na indução da resistência da infecção, que auxiliam na ativação daquelas, além de serem a principal fonte de $IFN\gamma$ durante a fase crônica da infecção, ao lado das células NK. A IL-2, associada a IL-12 produzida por macrófagos, estimulam a ação citotóxica de células NK e linfócitos T $CD8^+$ e o padrão “Th1” de resposta. O $IFN\gamma$, assim formado, atua mediando a destruição intracelular de parasitas por ativar células fagocíticas, sendo que esta ativação é resultante da indução do gene da síntese de níveis elevados de radicais intermediários do nitrogênio, principalmente óxido nítrico (NO). Além disso, a IL-12 participa da diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ em células Th1 produtoras de IL-2 e $IFN\gamma$, os quais estão envolvidos no controle da produção de imunoglobulinas IgG2a enquanto células Th2 por meio da IL-4, IL-5 e IL-10, induzem à produção de imunoglobulinas IgG1 (FIORENTINO et al., 1989; MOSMANN et al., 1986).

O cérebro é um sítio imunológico privilegiado, pois é capaz de excluir componentes do sistema imune pela barreira hematoencefálica (OWENS et al., 1994). Ele tem células especializadas, que produzem citocinas e executam funções efetoras imunológicas, e parece ter um mecanismo único de resposta imune. Quando uma infecção ocorre no cérebro, linfócitos infiltram-se no órgão, entretanto, é possível que células linfóides, os componentes regulares do sistema imune, e as células especializadas do cérebro para a resposta imune, auxiliem na defesa do hospedeiro contra a infecção (KANG & SUZUKI, 2001).

O aparecimento dos bradizoítos marca o início da fase crônica da infecção quando a replicação do parasita torna-se mais lenta (CARRUTHERS, 2002).

Segundo Van der Waaij (1959), provavelmente o *T.gondii* inicia o próprio encistamento tão cedo quanto se inicia a resistência específica. Às vezes, após a formação do cisto, os parasitas começam a penetrar a parede cística e formar novos cistos. Este modo de aumentar o número de cistos é diferente de outras partes do corpo. Isto não implica que o agente não seja liberado de cistos localizados em outras partes do corpo, mas quando ocorrem são destruídos pela resistência específica, que é muito mais intensa fora do cérebro.

Com isso, entende-se que os taquizoítos proliferam somente em estágios iniciais da infecção; após, persiste no organismo como cisto tecidual (SUZUKI et al., 1988b).

Comparados às infecções com oocistos, os bradizoítos de *T.gondii* foram menos infectantes e menos patogênicos para camundongos infectados oralmente, independentemente da dose ou cepa (DUBEY, 1997b). Infecções consistentes foram obtidas somente com a ingestão de 10^3 bradizoítos infectantes aos camundongos. Estes resultados indicam que uma proporção de bradizoítos é destruída no lúmen intestinal, até a conversão de bradizoítos em taquizoítos na lamina própria do intestino delgado, que ocorre dentro de 18 horas após a ingestão de bradizoítos (DUBEY, 1998b).

Os casos de reativação podem ocorrer quando um paciente infectado cronicamente com *T.gondii* se infecta, por exemplo, com o vírus da AIDS ou manifesta um câncer em seu organismo. Estas situações imunodeprimem o hospedeiro favorecendo com que o agente retorne a sua forma taquizoítica e reagudize a infecção. Desta maneira, o paciente não apresenta condições de combater o parasita, oportunista, e acaba morrendo devido ao diagnóstico tardio da enfermidade (TENTER et al., 2000).

Imunologicamente, a constante seleção de clones de células B é a responsável pelo aumento progressivo de anticorpos de alta avidéz. As células que produzem anticorpos de baixa afinidade vão sendo selecionadas negativamente por apoptose no folículo. Os linfócitos B de alta afinidade acumulam-se no centro germinativo onde serão selecionados para serem

células de memória (TARLINTON & SMITH, 2000). Assim, durante uma infecção, a avidéz de anticorpos reflete o tempo de maturação da resposta imune humoral ao seu agente, resguardadas as diferentes meias-vidas das células e das imunoglobulinas.

A afinidade de um anticorpo pelo seu antígeno depende de várias forças de interação podendo ser determinada quimicamente. Essa afinidade depende do ambiente químico onde a reação ocorre, sendo que a adição de substâncias pode afetar as interações químicas estáveis do anticorpo ou com o antígeno (HEDMAN et al., 1993).

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose é fácil, sendo realizado por provas sorológicas com a pesquisa de anticorpos IgM e IgG, mas a definição do momento da infecção é difícil, devido a prevalência de altos títulos de anticorpos IgG e a persistência de anticorpos IgM específicos entre indivíduos normais (BERTOZZI et al., 1999).

Para triagem em ampla quantidade de amostras, o teste do corante ou reação de Sabin-Feldman (SF) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) não são aconselháveis por várias razões. A Técnica de Aglutinação Direta Modificada (MAT), utilizando taquizoítos inativados pela formalina, para a detecção de IgG tem sido amplamente utilizada em muitas espécies de animais domésticos e silvestres, sendo muito sensível, específica e de fácil realização.

Nas gestantes, a confirmação da infecção materna é baseada no perfil sorológico com a determinação da resposta humoral, pela pesquisa de anticorpos específicos e suas classes, devido a dificuldade em isolamento do parasita nesta fase da infecção (CAMARGO et al., 1991).

Segundo et al. (2004) verificaram diferenças na qualidade de vida, durante a gravidez, em pacientes atendidas em hospitais da rede pública e privada de Uberlândia, MG, onde a soroprevalência para anticorpos IgG para *T.gondii* em gestantes foi maior na população atendida nos hospitais da rede pública. Com isso, enfatiza-se a importância do acompanhamento sistemático dos programas de triagem sorológica durante a gravidez para prevenir a ocorrência de um número elevado de crianças com toxoplasmose congênita.

Pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e que apresentam duas ou mais lesões cerebrais devidas à toxoplasmose,

detectadas por tomografia computadorizada ou ressonância magnética, ou em que há suspeita de encefalite toxoplásmica, necessitam de métodos específicos e sensíveis, porém não invasivos, para o diagnóstico da etiologia da encefalite. Estudos indicam que testes de aglutinação paralelos de amostras de soro com antígenos inativados pela formalina e acetona podem diagnosticar de 70 a 80% dos pacientes com AIDS com encefalite toxoplásmica, onde normalmente são casos de reativação de infecções crônicas (SUZUKI et al., 1988a).

Os soros de pacientes com infecção toxoplásmica aguda aglutinam tanto com antígenos inativados pela formalina como pela acetona, porém os soros de pacientes com infecção crônica apresentam títulos de aglutinação para antígeno inativado pela formalina, enquanto que, para o antígeno inativado pela acetona, os títulos são menores ou negativos. Isto é bem conhecido em pacientes com lesões locais (coriorretinites recidivantes, pacientes com AIDS e abscessos cerebrais). Isto se deve, principalmente, a presença de diferentes antígenos de membrana no toxoplasma, podendo induzir a síntese de diferentes IgG aglutinantes (THULLIEZ et al., 1986).

Com o aprimoramento da sensibilidade das técnicas utilizadas na detecção de IgM, o número de pacientes com esta classe de anticorpo passou a incluir uma grande proporção de mães com infecção não recente, e como consequência houve a introdução custosa e desnecessária de antibióticos, como a espiramicina, em muitas pacientes, pois pela alta sensibilidade, a IgM pode permanecer positiva por um período de tempo de até alguns anos após a infecção aguda (PONS et al., 1995).

Os ensaios imunoenzimáticos de fase sólida (ELISA) utilizam antígenos solúveis do parasita que se ligam às superfícies adsorventes de placas, permitindo a adesão dos anticorpos específicos a um substrato sólido. Após lavagens, estes anticorpos podem reagir com anticorpos secundários específicos ligados a uma enzima que permite, pela reação enzimática a produtos coloridos, quantificar os anticorpos aderidos, o que têm se mostrado muito específico (PELLOUX et al., 1998). Apesar dos testes de ELISA serem os mais sensíveis e, permitirem automação, sua alta sensibilidade prejudica a determinação temporal do momento da infecção. Usualmente, utilizando-se

testes menos sensíveis como a RIFI, pode-se determinar a evolução da resposta humoral da toxoplasmose.

A determinação da avidéz é baseada no tratamento dos anticorpos ligados ao antígeno, em um suporte sólido, com um agente caotrópico que é capaz de retirar os anticorpos de menor afinidade. Os anticorpos de alta avidéz permanecem ligados ao antígeno após o tratamento da amostra, e a proporção entre os anticorpos de baixa e alta avidéz é um indicador do período de infecção da amostra estudada (HEDMAN et al., 1993).

O teste de avidéz para IgG foi desenvolvido para auxiliar na diferenciação da infecção crônica de uma recente. Os resultados são baseados na mensuração da avidéz (afinidade funcional) de anticorpos IgG específicos ao toxoplasma. Mediante a um desafio antigênico, os anticorpos produzidos usualmente tem um baixo nível de afinidade. Durante o curso da resposta imune, há a maturação do anticorpo cuja afinidade aumenta progressivamente com as semanas e meses. O aumento na afinidade da IgG resulta de um processo de seleção das células B dirigidas ao antígeno, redundando em um aumento na complementaridade do sítio de ligação antígeno-anticorpo. Esta estreita ligação do anticorpo ao antígeno é estabelecida por forças químicas tais como pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas e de Van der Waals. No ELISA por avidéz de IgG, para *T.gondii*, a uréia ou outro agente denaturante de proteína é utilizado para dissociar o complexo antígeno-anticorpo. O título resultante reflete a IgG total e resistente a uréia e é determinado utilizando graus de densidade óptica (DO) de amostras tratadas e não tratadas com uréia (REMINGTON et al., 2004).

Esta técnica necessita de uma boa padronização para permitir uma definição individual em gestantes suspeitas que deveriam sofrer procedimentos invasivos ou terapia agressiva. Esta definição individual é muito complexa, pois as condições de determinação dependem de inúmeros fatores como pH, temperatura ambiental, diluição do soro e preparações de antígenos, além dos sistemas de revelação do anticorpo (CAMARGO et al., 1991). Problemas podem estar relacionados ao uso de agentes caotrópicos variados e condições experimentais individuais a cada local, associados à experiência prévia do executor. A padronização da técnica é complexa, e apesar de existirem kits comerciais disponíveis, resultados conflitantes são muito freqüentes

(HOLLIMAN, 1995; BARBIERI et al., 2001). O uso de antígenos recombinantes pode diminuir a variabilidade desses ensaios por ter menor número de epítomos envolvidos.

A avidéz de anticorpos IgG está diretamente relacionada com a proliferação de linfócitos de sangue periférico. A evolução da avidéz de anticorpos IgG na toxoplasmose é um processo que ocorre de maneira similar em várias espécies de mamíferos e sua medida é proporcional ao tempo de infecção e à eficiência da imunização, refletindo indiretamente a memória imunológica do hospedeiro ao agente (MEIRELES, 2005).

Meireles (2005) verificaram que a avidéz medida pelo título de anticorpos (Avt) foi mais precisa possuindo uma relação linear com a quantidade de anticorpos. O título está relacionado à quantidade de anticorpos circulantes, já a avidéz está associada à qualidade dos anticorpos, refletindo indiretamente a seleção de clones de células B produtoras de anticorpos envolvidas nos processos de maturação da produção destes anticorpos e estabelecimento de células de memória.

Macre (2002) verificou que o índice de avidéz determinado em diluição limitada do soro, restrita a absorbância das diluições 2,5 e 0,5, apresenta boa relação com o teste de triagem. A avidéz restrita (Avr) é determinada utilizando-se a maior diluição de soro que fornece uma absorbância do ELISA acima e/ou mais próxima de 1,0.

Vários relatos têm mostrado que a avidéz dos anticorpos IgG é um bom parâmetro do momento da infecção, definindo-a como tendo ocorrido até entre um período de seis a oito meses da colheita, tempo em que os anticorpos de baixa avidéz ainda não foram substituídos pelos de alta avidéz (JONES et al., 2001). Após este período, a infecção é caracterizada pela produção de anticorpos de alta avidéz, que são mantidos ao longo da vida do indivíduo (SOUZA et al., 1997). A determinação da avidéz de anticorpos em gestantes suspeitas de infecção aguda mostrou que este teste é melhor que a simples detecção de IgM na previsão da infecção recente, já que essa classe de anticorpo pode persistir na circulação por um período maior de tempo.

Hedman et al. (1989) verificaram que cinco pacientes com infecção aguda, apresentavam baixa avidéz para IgG específica para toxoplasma, permanecendo esta por vários meses até o aparecimento dos sintomas. Por

outro lado, todos os 21 pacientes que apresentavam uma imunidade passada, de uma infecção crônica, tinham uma alta avidéz para IgG para toxoplasma. Tendo em vista estes resultados, sua aplicação é de grande utilidade para o diagnóstico da infecção adquirida, além de identificar nas pacientes gestantes o risco da toxoplasmose congênita.

Qualquer que seja a incidência local, o problema do diagnóstico da infecção materna só pode ser comprovado absolutamente pela detecção de soroconversão (GIRALDO et al., 2002). Desta forma, a introdução de novos métodos mais sensíveis, fáceis de realizar, sem a necessidade de equipamento técnico especial, possibilitam uma menor discriminação do teste e, conseqüentemente, aumento da população considerada em risco de infecção congênita (MACRE, 2002).

Dentre as provas sorológicas para a detecção de anticorpos específicos anti-*T.gondii* têm-se a MAT, que consiste em um teste simples, não espécie-específico e pode ser usado tanto em humanos quanto em soros de animais. A MAT detecta apenas IgG, porque o 2-mercaptoetanol (2ME), utilizado no teste, inativa as IgM específicas e não específicas. No entanto, o teste pode ser realizado com a utilização de acetona ou formalina como inativadores dos taquizoítos, permitindo assim diferenciar as IgGs de fase aguda e crônica da infecção (WILSON et al., 1990).

A técnica de aglutinação direta (DAT) para toxoplasmose foi descrita pela primeira vez por Fulton (1965a). É uma técnica simples, acurada e de fácil leitura, podendo ser aplicada independentemente da espécie estudada. Porém a técnica original apresentava baixa sensibilidade e especificidade, esta última principalmente devido a ligação das imunoglobulinas M normais, presentes na superfície do parasita.

Desmots & Remington (1980) utilizaram o 2ME 0,2M para aumentar a especificidade da DAT, se tornando uma técnica tão útil como o SF. Em 2000 amostras de soro de pacientes testadas, houve concordância de 98% entre os dois métodos. Verificaram, ainda, que os títulos na MAT foram menores que os obtidos na SF, durante a infecção de fase aguda, enquanto que para a infecção de fase crônica foram maiores que na SF. Assim, a MAT pode ser utilizada como prova de triagem, menos dispendiosa, principalmente em mulheres

soronegativas, durante a gravidez, e também, para a detecção de soroconversão.

Os laboratórios menos sofisticados necessitam uma prova de triagem, confiável para toxoplasmose, enquanto que outros de referência, podem optar pela utilização de um segundo método, concomitantemente, para minimizar erros quando um grande número de amostras é processado. Visando comparar a performance da MAT com a técnica de aglutinação em látex (LAT), para a detecção de imunoglobulina G (IgG) específica para toxoplasma, Johnson et al. (1989), utilizando 400 amostras de soro estocadas, encontraram uma sensibilidade de 99% para a LAT, superior à MAT (96%), porém com especificidade de 81%, inferior à MAT, que foi de 98%. Com isso, concluíram que os dois métodos podem ser utilizados conjuntamente, com a finalidade de se obter um resultado altamente sensível e específico.

Gamble et al. (1999) encontraram uma prevalência regional de 47,4%, em 77 propriedades suínas, verificando que a educação por práticas adequadas de manejo nas propriedades pode reduzir a exposição ao *T.gondii*. Marca et al. (1996), comparando a RIFI e a MAT em 2306 amostras de soro ovino, detectaram uma soroprevalência de 35,27% para MAT e 33,72% para RIFI, considerando-as como similares.

Montoya (2002) definiu a importância dos testes de aglutinação utilizando taquizoítos inativados pela acetona (MAT-AA) e formalina (MAT-AF), para aferir e quantificar os níveis de IgG de diferentes estágios da infecção. Ao analisar três diferentes provas sorológicas (SF, ELISA para IgM, IgA e IgE e, MAT-AA e MAT-AF), demonstrou que soros positivos para o SF, negativos no ELISA para IgM, IgA e IgE e que revelaram um padrão crônico na MAT-AA e MAT-AF são tipicamente encontrados em pacientes infectados em um passado mais distante, e que a combinação de altos títulos no SF, ELISA IgM, IgA e IgE positivo e, padrão agudo na MAT-AA e MAT-AF é altamente sugestivo de uma infecção recentemente adquirida.

Suzuki et al. (1988b) verificaram que os anticorpos produzidos em camundongos imunizados com antígeno inativado com acetona foram específicos de taquizoítos, onde estes anticorpos reagiram somente com a superfície celular de taquizoítos, e os produzidos a partir de camundongos

imunizados com antígeno inativado pela formalina reagiram tanto com a superfície de taquizoítos como de bradizoítos.

A acetona poder remover certos antígenos da membrana da célula ou alterar os antígenos de tal forma que, estes não apresentem reação cruzada com os antígenos de bradizoítos. Os taquizoítos se proliferam somente nos estágios iniciais da infecção. Assim, a resposta imunogênica eliciada especificamente pelos taquizoítos, ocorre somente durante o estágio agudo da infecção, o que pode explicar porque a MAT-AA é capaz de diagnosticar este estágio da infecção.

Na MAT-AF, os antígenos reagem com anticorpos dirigidos tanto contra antígenos 27kDa (típico de fase aguda) como contra antígenos de 35kDa (típicos de fase crônica), enquanto que na MAT-AA aglutinam somente antígenos de 27kDa. Desta forma, consegue-se distinguir a fase aguda da fase crônica da infecção usando-se as duas provas concomitantemente. Isto é marcadamente observado em pacientes com lesões locais, sinais de coriorretinite, pacientes com AIDS e com abscessos cerebrais (THULLIEZ et al., 1986).

OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

Objetivos Gerais

1. Padronizar a técnica de aglutinação direta modificada utilizando-se a acetona ou o metanol como inativador do antígeno, visando diferenciar as IgGs de fase aguda e crônica, da infecção;
2. Avaliar a detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Toxoplasma gondii*, de fase aguda, comparadas às de fase crônica da infecção, e verificar a cinética dos mesmos frente a reagudização da infecção crônica assim como sua avidéz.

Objetivos Específicos

1. Padronizar a produção de grande quantidade de taquizoítos, usando células sarcomatosas, para a utilização como antígeno nas provas sorológicas de aglutinação;
2. Comparar as técnicas de sedimentação espontânea e de centrifugação para melhorar a produção de antígeno rico em taquizoítos;
3. Comparar a acetona e o metanol como inativadores do antígeno de fase aguda, na sua produção e na realização das provas sorológicas;
4. Padronizar o protocolo de imunodepressão na infecção crônica por *T.gondii*, em ratas Wistar;
5. Avaliar a cinética de anticorpos séricos, por meio de provas sorológicas, em ratas infectadas com bradizoítos de *T.gondii*, seguidas ou não da reagudização pela utilização de imunodepressor.

*M*ATERIAL E *M*ÉTODOS

IV - MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses - NUPEZO, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP. A sorologia pela técnica de ELISA por avidéz de IgG, foi realizada no Laboratório de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

4.1. Animais de experimentação

Para a produção dos antígenos foram utilizados camundongos Swiss Webster, albinos, não isogênicos, de 30 dias de idade, com 30 a 40g. Ratas (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, albinas, não isogênicas, de 30 dias de idade, com 50 a 80g, foram utilizadas para inoculação, via oral, de bradizoítos de *T.gondii*. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu.

4.2. Cepa de Sarcoma murino TG180

As células de sarcoma linhagem TG180 são células tumorais derivadas do sarcoma ATCC (CCRF5-180 II), em 1958. Estas células se multiplicam como um tumor ascítico em camundongos e são comumente utilizadas para obtenção de uma grande quantidade de taquizoítos, quando da inoculação concomitante do parasita com a célula.

Para a manutenção desta linhagem tumoral em camundongos inoculou-se, pela via intraperitoneal, cinco camundongos de 30 dias de idade, com 0,2ml do lavado peritoneal de um camundongo previamente inoculado. Após 12 dias, procedeu-se o sacrifício em câmara saturada de vapor de isofluorano do camundongo que apresentou maior grau de ascite, com a porção ventre abdominal mais rosada. Fixou-se o animal em decúbito dorsal, procedendo-se a anti-sepsia da região ventral com álcool iodado, colhendo-se o líquido ascítico com seringa de 1ml e agulha 30mmx8mm. Aqueles que não estivessem leitosos ou hemorrágicos foram desprezados, sacrificando-se outro animal, na busca de material adequado. Outros cinco animais foram inoculados

com parte do material recém obtido. Os camundongos restantes foram sacrificados assim que os da nova passagem desenvolveram ascite (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

4.3. Cepas de *Toxoplasma gondii*

Para a produção de antígeno utilizado em todas as provas sorológicas realizadas neste experimento foi utilizada a cepa RH, isolada por Sabin em 1939 de uma criança nos Estados Unidos (SABIN, 1941), pertencente ao genótipo I. Esta é mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss, albinos, com 1ml de exsudato peritoneal obtido de camundongos previamente inoculados.

Para a inoculação das ratas dos grupos experimentais foi utilizada a cepa BTU10, isolada de cérebro de cão, com sintomatologia nervosa, atendido no ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, caracterizada como genótipo I e, mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss, albinos, com 1ml de exsudato peritoneal obtido de camundongos previamente inoculados. Esta cepa apresenta comportamento patogênico para camundongos albinos e, formação de cistos teciduais cerebrais em ratas.

4.4. Produção de antígeno

4.4.1. Técnica de aglutinação direta modificada (MAT)

Foram inoculados 20 camundongos, via intraperitoneal, com 1ml das suspensões da cepa RH, previamente selecionada. Foi colhido o exsudato peritoneal destes, três dias após, por lavagem intraperitoneal com 10ml de solução salina 0,95% estéril, por animal. Os exsudatos foram observados e avaliados ao microscópio e aqueles ricos em parasitas e livres de contaminação bacteriana, hemácias e leucócitos, foram homogeneizados, volume a volume, com líquido ascítico tumoral (células de sarcoma murino TG180), previamente diluído a 1/8 em solução salina 0,95% estéril, para obter um volume final de 60ml de suspensão. Com esta suspensão de taquizoítos e células tumorais, foram inoculados 60 camundongos Swiss, com 40 dias de

idade (2ml para cada). Dois dias após a inoculação, foi colhido o exsudato, como descrito anteriormente (DESMONTS & REMINGTON, 1980). Os lavados foram separados e submetidos a duas técnicas diferentes: centrifugação e sedimentação espontânea.

4.4.1.1. Centrifugação

Os lavados peritoneais obtidos, foram analisados em microscópio óptico e aqueles que apresentavam somente taquizoítos foram separados para serem utilizados em volume completo, ou seja, puro. Os demais foram homogeneizados e submetidos a um esquema de centrifugação, com rotação variável. Iniciou-se com centrifugação da suspensão de células e taquizoítos a 65g por cinco minutos. Pipetou-se o sobrenadante, onde se encontravam os taquizoítos, para outro tubo de centrífuga. O sedimento foi desprezado. O sobrenadante foi centrifugado novamente, a 440g por 20 minutos, pipetando-se o mesmo para outro tubo. O sedimento obtido foi ressuspenso em solução salina 0,95%, e centrifugado a 260g por dez minutos. O sobrenadante foi acondicionado em tubo de centrífuga, para posterior inativação, desprezando-se o sedimento.

4.4.1.2. Sedimentação espontânea

Ao contrário da técnica anterior, não se homogeneizou a suspensão dos tubos. Os lavados peritoneais foram mantidos em repouso durante 70 minutos. Realizou-se a análise de 20µl da fase líquida mais superficial do líquido peritoneal (A), da fase líquida intermediária (B), da fase líquida mais profunda (C) e do sedimento (D), como ilustra a Figura 1, em lâmina coberta com lamínula 22mmx22mm, a cada cinco minutos, examinando-se ao microscópio óptico. Foram analisados todos os lavados, e todos puderam ser utilizados, independentemente da quantidade de células, desde que não apresentassem contaminação bacteriana e/ou hemácias. A seguir, transferiram-se as fases A, B e C de todos os lavados, considerados adequados, para um becker de 600ml, para se proceder a inativação.

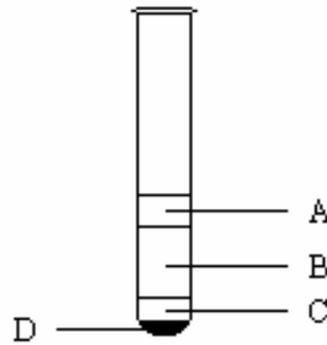


Figura 1 – Ilustração das fases do lavado peritoneal analisadas. Botucatu, 2006

A é a fase líquida mais superficial, B a fase líquida intermediária, C a fase líquida mais profunda e D é o sedimento.

4.4.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A solução antigênica foi obtida de lavados intraperitoneais realizados em camundongos, previamente inoculados via intraperitoneal com suspensão contendo taquizoítos da cepa RH (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

4.4.3. Ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA) – (MINEO, 1982)

A obtenção do antígeno foi feita a partir de exsudatos peritoneais contendo taquizoítos de *T.gondii*, obtidos pela inoculação prévia de camundongos e processamento como descrito por Mineo (1982), com pequenas modificações. Do exsudato peritoneal de animais infectados, foram removidas as células por centrifugação diferencial, sendo lavado com SST 0,01M pH 7,2, e filtração em membrana de policarbonato, para a remoção dos macrófagos peritoneais. O sedimento, contendo taquizoítos, foi ressuspensionado em SST 0,01M pH 7,2 e contado em Câmara de Neubauer. Após nova centrifugação, ao sedimento foi adicionado água destilada, para permitir uma concentração de 10^8 parasitas/ml. A suspensão de parasitas foi submetida à ruptura sônica¹, a 40 ciclos por 5 a 10 minutos de 30 segundos, em banho de gelo, até que ocorresse lise completa dos parasitas, sob observação em microscópio óptico. Em seguida, acrescentou-se igual volume de solução de NaCl 0,3M para isotonzar a suspensão, e centrifugou-se a 10.000g por 30

minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada², sendo que o sobrenadante foi usado como antígeno salino solúvel total. A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 0,5ml, armazenadas a -70°C.

4.4.3.1. Padronização do extrato antigênico solúvel para o ELISA

O extrato antigênico solúvel com teor protéico de 410µg/ml foi testado nas concentrações de 0,01, 0,1, 1 e 10µg/ml frente aos soros controle positivo e negativo nas diluições 1:100 e 1:1000 (Gráfico 1). O conjugado anti-IgG de rato, espécie-específica e imunoglobulina-específica, biotilado, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Hiro Goto³, foi diluído em diferentes concentrações e combinações com diferentes concentrações de avidina conjugada a peroxidase. Testaram-se as concentrações e combinações de conjugado (C) e avidina (A) como segue: C1:5000+A1:5000; C1:5000+A1:10000; C1:10000+A1:5000; C1:10000+A1:10000. Todo o procedimento foi realizado concomitantemente para amostras de soro não tratadas (ELISA normal), como tratadas com uréia (avidez). Tanto os soros como os conjugados foram utilizados no volume final de 100µl/poço e permaneceram incubados a 37°C por uma hora.

4.5. Inativação do antígeno

4.5.1. Técnica de aglutinação direta modificada (MAT)

4.5.1.1. Inativação do antígeno pela formalina (AF)

Adicionou-se volume a volume solução de formalina-12% (formaldeído-6%), diluída em SST 0,01M pH 7,2, à suspensão com parasitas, incubando-se *overnight*, em temperatura ambiente. No dia seguinte, centrifugou-se a 600g por 10 minutos e, o sedimento, foi ressuspenso em 50ml SST 0,01M pH 7,2. O processo foi repetido mais duas vezes, para remover todo o formaldeído, e finalmente ressuspenso em solução tampão

¹ Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc.®, USA

² Eppendorf 5403 Refrigerated Microcentrifuge, Eppendorf®

³ Responsável pelo Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia Celular e Molecular, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

borato pH 8,7. A suspensão final, contendo 2×10^4 parasitas por μl , foi conservada a 4°C (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

4.5.1.2. Inativação do antígeno pela acetona (AA)

Foram avaliados 24 protocolos, onde o antígeno fora adicionado de acetona PA em diferentes concentrações e diferentes períodos de incubação, sob refrigeração, como descrito por Thulliez et al. (1986), ou em temperatura ambiente, seguidos de centrifugações sucessivas a 600g por 10 minutos, desprezando-se o sedimento, e cujos sedimentos foram ressuspensos em dois tipos de soluções, uma tamponada e outra salina, como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Protocolos utilizados para a produção de antígeno, inativado pela acetona (MAT-AA). Botucatu, 2006

Protocolo	Concentração (vol. final)	Incubação*	Ressuspensionado em
1	Acetona 30%	Geladeira 48h	Tampão borato pH 8,9
2	Acetona 30%	Geladeira 48h	Solução salina 0,95%
3	Acetona 10%	Geladeira 48h	Tampão borato pH 8,9
4	Acetona 10%	Geladeira 48h	Solução salina 0,95%
5	Acetona 30%	Geladeira 24h	Tampão borato pH 8,9
6	Acetona 30%	Geladeira 24h	Solução salina 0,95%
7	Acetona 10%	Geladeira 24h	Tampão borato pH 8,9
8	Acetona 10%	Geladeira 24h	Solução salina 0,95%
9	Acetona 30%	Ambiente 24h	Tampão borato pH 8,9
10	Acetona 30%	Ambiente 24h	Solução salina 0,95%
11	Acetona 30%	Geladeira 72h	Tampão borato pH 8,9
12	Acetona 30%	Geladeira 72h	Solução salina 0,95%
13	Acetona 10%	Geladeira 72h	Tampão borato pH 8,9
14	Acetona 10%	Geladeira 72h	Solução salina 0,95%
15	Acetona 10%	Ambiente 24h	Tampão borato pH 8,9
16	Acetona 10%	Ambiente 24h	Solução salina 0,95%
17	Acetona 30%	Ambiente 48h	Tampão borato pH 8,9
18	Acetona 30%	Ambiente 48h	Solução salina 0,95%
19	Acetona 10%	Ambiente 48h	Tampão borato pH 8,9
20	Acetona 10%	Ambiente 48h	Solução salina 0,95%
21	Acetona 30%	Ambiente 72h	Tampão borato pH 8,9
22	Acetona 30%	Ambiente 72h	Solução salina 0,95%
23	Acetona 10%	Ambiente 72h	Tampão borato pH 8,9
24	Acetona 10%	Ambiente 72h	Solução salina 0,95%

* Temperatura de geladeira 4°C

Em todos os casos, as suspensões finais, contendo 3×10^4 parasitas por μl , foram conservadas a 4°C (THULLIEZ et al., 1986).

4.5.1.3. Inativação do antígeno pelo metanol (AM)

Foram avaliados dois protocolos, onde o antígeno fora adicionado de metanol PA na concentração final de 25%, como descrito por Thulliez (2005), como segue.

No protocolo 1, centrifugou-se a solução rica em antígeno a 700g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 150ml de SST 0,01M pH 7,2, contendo 3ml de tripsina 2,5% e 4000U de heparina sódica, para romper todas as células remanescentes. Incubou-se a solução em estufa a 37°C sob agitação constante por 30 minutos. Centrifugou-se a 1500g por 15 minutos. Lavou-se duas vezes em SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1% a 700g por 15 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 120ml SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1% sob agitação constante em temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se rapidamente 40ml de metanol, de modo que a concentração final ficasse em 25% de metanol, e manteve-se sob agitação por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, incubou-se a solução em erlenmeyer de 250ml, sob repouso, a 4°C por 36 horas. Após a incubação, centrifugou-se o sedimento a 4000g por 30 minutos, desprezou-se o sobrenadante, e o sedimento foi ressuspendido em 10ml de SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1%, sendo então centrifugado a 4000g por 10 minutos. Repetiu-se este procedimento por duas vezes. Ressuspendeu-se o sedimento final com 20 a 30ml de SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1% e azida sódica 0,15% (NaN_3), sendo estocado a 4°C até o momento da utilização.

No protocolo 2, procedeu-se como descrito anteriormente, sendo que a única diferença foi no momento da incubação. Ao invés de manter-se a solução de antígeno com metanol 25%, em repouso, manteve-se a solução sob agitação constante em agitador magnético⁴, sob a temperatura de 4°C , pelo mesmo período de 36 horas.

⁴ Agitador magnético, modelo 702, n° série 70045, Fisatom®

4.5.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) – (CAMARGO, 1974)

Ao exsudato peritoneal rico em taquizoítos foi misturado igual volume de solução formalina 2%, obtendo-se uma suspensão de exsudato-formol a 1%. Esta suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga e incubada em estufa a 37 °C por 30 minutos, agitando-a por inversão delicada, a cada 10 minutos. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 1600g por cinco minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 2ml de solução salina 0,85% e centrifugado a 1600g por 10 minutos. Novamente desprezou-se o sobrenadante, ressuspendendo o sedimento em solução salina 0,85% até se obter de 20 a 30 parasitas por campo microscópico, colocando-se 50µl da suspensão final entre a lâmina e a lamínula 24mmx60mm, utilizando-se o aumento de 40 vezes para a realização de leitura, para a observação dos taquizoítos.

Para fixar o antígeno, transferiu-se 10µl da solução antigênica, com pipeta automática, sobre os orifícios de lâmina de vidro especial para RIFI⁵, aspirando-se o excesso em seguida, restando somente uma fina película sobre cada orifício, após secagem à temperatura ambiente.

4.6. Grupos controles

4.6.1. Obtenção de bradizoítos

Camundongos Swiss Webster, infectados cronicamente com bradizoítos da cepa BTU10, após o período de 60 DPI e submetidos ao tratamento nos 12 primeiros dias de infecção com sulfadiazina (400mg/l mais 10g/l de bicarbonato de sódio) na água-de-bebida, e confirmação sorológica pela MAT-AF, foram sacrificados em câmara saturada de vapor de isofluorano. O cérebro foi removido, macerado em gral com pistilo, adicionado de 0,5ml de solução salina 0,85%, estéril, homogeneizado e submetido a contagem de cistos, pela adição de 25µl da suspensão em lâmina de vidro, coberta com lamínula 22mmx22mm, para observação em microscópio óptico, objetiva 40x. Após a contagem de cistos, procedeu-se a digestão pela pepsina para liberação dos bradizoítos do interior dos cistos, de acordo com o protocolo descrito por Dubey (1998a).

⁵ Perfecta®

Após a contagem de cistos, procedeu-se a digestão pela pepsina para liberação dos bradizoítos do interior dos cistos, de acordo com o protocolo descrito por Dubey (1998a). Completou-se o volume da suspensão de tecidos para 10ml, com solução salina 0,85% e adicionou-se igual volume de solução ácida de pepsina previamente aquecida a 37°C, incubando-se por cinco minutos, sob agitação constante. Em seguida, a suspensão foi neutralizada com igual volume de solução de bicarbonato de sódio 1,2% e centrifugada a 1200g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com solução salina 0,85% para 1ml.

4.6.2. Sensibilização dos controles

As ratas Wistar foram agrupadas em três grupos experimentais:

Grupo 1 (G1) – Quatro animais receberam, pela via oral, 10^4 bradizoítos de *T.gondii*, com auxílio de gavage;

Grupo 2 (G2) – Quatro animais receberam, pela via oral, 10^4 bradizoítos de *T.gondii*, com auxílio de gavage. Aos 155 DPI, iniciou-se o esquema de imunodepressão com dexametasona, via oral a cada 48 horas, e com succinato sódico de hidrocortisona, via subcutânea, a cada 108 horas, segundo protocolo de Djurkovic-Djakovic & Milenkovic (2001), adaptado pelo protocolo de extrapolação alométrica interespecífica, descrito por Pachaly & Brito (2001), com base no peso dos animais. As doses para cada uma das drogas são mencionadas no Quadro 2.

Grupo 3 (G3) – Quatro animais receberam, pela via oral, solução salina 0,95% estéril, com auxílio de gavage (grupo controle).

Os animais dos grupos G1 e G3 foram mantidos sob observação por período de três meses a partir da infecção, e os do grupo G2 por sete meses, efetuando-se colheitas semanais de sangue para obtenção de soro e sacrificados, em câmara saturada com vapor de isoflurano, ao final do período de observação.

Quadro 2 – Doses de administração de dexametasona e hidrocortisona, calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica, de acordo com o método descrito por Pachaly & Brito (2001). Botucatu, 2006

Peso das ratas em Kg	Dose da dexametasona em mg/Kg	Dose total de dexametasona, em mg	Dose de hidrocortisona em mg/Kg	Dose total de hidrocortisona, em mg
0,205	1,397	0,286	27,944	5,729
0,210	1,389	0,292	27,776	5,833
0,215	1,381	0,297	27,613	5,937
0,220	1,373	0,302	27,455	6,040
0,225	1,365	0,307	27,301	6,143
0,230	1,358	0,312	27,152	6,245
0,235	1,350	0,317	27,006	6,346
0,240	1,343	0,322	26,864	6,447
0,245	1,336	0,327	26,726	6,548
0,250	1,330	0,332	26,591	6,648
0,255	1,323	0,337	26,460	6,747
0,260	1,317	0,342	26,332	6,846
0,265	1,310	0,347	26,207	6,945
0,270	1,304	0,352	26,085	7,043
0,275	1,298	0,357	25,965	7,140
0,280	1,292	0,362	25,849	7,238
0,285	1,287	0,367	25,735	7,334
0,290	1,281	0,372	25,623	7,431
0,295	1,276	0,376	25,514	7,527
0,300	1,270	0,381	25,407	7,622

4.7. Colheita de materiais

4.7.1. Colheita de sangue

Amostras de sangue foram colhidas no dia da inoculação das ratas, semanalmente, e no dia do sacrifício dos animais, pela punção do seio orbital. O soro sanguíneo foi obtido por centrifugação a 1600g por 10 minutos, transferido para microtubos identificados e congelados a -20°C até a realização dos exames sorológicos.

Todas as amostras de soro foram separadas em três alíquotas (1- para MAT-AM e MAT-AF; 2- para RIFI-IgM e RIFI-IgG; 3- para ELISA-IgG), para evitar o freqüente congelamento e descongelamento das amostras, e conseqüente interferências nos resultados das provas sorológicas.

4.7.2. Colheita de tecidos

Após a antissepsia dos animais com álcool iodado, os cérebros e musculatura (músculos estriados e coração constituem uma só amostra) foram colhidos com tesouras e pinças estéreis, em câmara de fluxo laminar, e transferidos para erlenmeyers individuais identificados, e mantidos sob refrigeração até o processamento da bioprova para reisolamento do parasita. Foram preparadas lâminas com “*imprints*” de cérebro, baço, fígado e pulmão, fixados em metanol e corados pela coloração de Giemsa.

4.8. Provas sorológicas

4.8.1. Técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pela acetona (MAT-AA)

As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo chato⁶, e foi transferido 25µl de cada diluição (1:16, 1:64 até 1:65536) para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em “V”⁷, e 25µl de 2-mercaptoetanol 0,2M, diluído em solução tampão borato pH 8,9, e 50µl do antígeno diluído em solução tampão borato pH 8,9 foram adicionados às cavidades. Em provas separadas, as amostras de soro foram testadas frente ao antígeno inativado pela acetona, pela formalina e pelo metanol. As placas foram seladas com filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas a temperatura 32 °C, por 12 a 16 horas (THULLIEZ et al., 1986) procedendo-se a leitura com interpretação dos resultados. Foi considerado positivo, quando houve a formação de uma película cobrindo pelo menos metade do fundo da cavidade, e negativo quando houve a formação de “botão-de-fundo” na mesma.

4.8.2. Técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pelo metanol (MAT-AM)

As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo chato, e foi transferido 50µl de cada diluição do soro (1:16, 1:64 até 1:65536) para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em “V”, e 50µl de 2-mercaptoetanol 0,2M, diluído em solução tampão borato pH 8,97 (MAT-AM), e 50µl do antígeno, diluído em solução tampão borato pH 8,97, foram

⁶ Maxi Sorp[®]

⁷ Greiner[®]

adicionados às cavidades. Em provas separadas, as amostras de soro foram testadas frente ao antígeno inativado pela formalina, pela acetona e pelo metanol. As placas foram seladas com filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas a temperatura de 30°C, *overnight* (THULLIEZ, 2005) procedendo-se a leitura com interpretação dos resultados. O critério adotado para positividade ou negatividade foi o descrito anteriormente.

4.8.3. Técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pela formalina (MAT-AF)

As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo chato, e foi transferido 25µl de cada diluição do soro (1:16, 1:64 até 1:65536) para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em “V”, e 25µl de 2-mercaptoetanol 0,2M diluído em SST 0,01M pH 7,2, e 50µl do antígeno diluído em solução tampão borato pH 8,7 foram adicionados às cavidades. As placas foram seladas com filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas a temperatura ambiente, *overnight*, no caso do antígeno inativado pela formalina (DESMONTS & REMINGTON, 1980) procedendo-se a leitura com interpretação dos resultados. Adotou-se como critério para os resultados, o estabelecido anteriormente. A MAT foi realizada ao mesmo momento com os três tipos de antígenos, para evitar interferências, e desnaturação protéica, com o congelamento e descongelamento.

4.8.4. Ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA)

Todas as amostras de soro foram adicionadas em dois poços da placa de poliestireno, para todas as diluições de soro. Um poço foi utilizado como descrito acima (ELISA sem uréia), e o outro poço foi tratado com uréia 8M para permitir a avaliação do grau de maturação das IgGs anti-*T.gondii*.

A técnica foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita por Venkatesan & Wakelin (1993). Placas de poliestireno de 96 poços⁸ para microtitulação foram sensibilizadas com 100µl/poço com extrato antigênico protéico de *T.gondii*, suspensas em solução tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5, na concentração de 1µg/ml de antígeno. Após sensibilização por 24

⁸ Costar®

horas a 4°C, em câmara úmida, as placas foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com SST 0,01M pH 7,2 contendo 0,02% de Tween 20 (PBST), sendo em seguida submetidas à secagem. Após, foram bloqueadas com 200µl de 3% de solução de leite desnatado (PBSTL), em incubação por uma hora em estufa de 37°C.

Após bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes em PBSTL, e as amostras de soros (100µl/poço), diluídas 1:100, 1:400, 1:1000, 1:1600, 1:4000, 1:6400, 1:16000, 1:64000 em PBSTL, foram depositadas nas placas e incubadas a 37°C por uma hora.

No caso do tratamento com uréia 8M, antes da adição do conjugado, adicionou-se 100µl de uréia 8M às amostras. Nas cavidades sem tratamento (ELISA normal), foram adicionadas de 100µl de PBSTL, e as placas foram então incubadas a 37°C por 15 minutos.

Após três novas lavagens com PBSTL, foram então aplicados 100µl por cavidade de anti-IgG de rato, biotinizado, e a placa foi, novamente, incubada por uma hora a 37°C. Seguiu-se de três lavagens em PBSTL, e após secagem, adicionou-se 100µl/poço de avidina conjugada a peroxidase, diluída em PBSTL, com título pré-estabelecido.

Após três lavagens com PBSTL, a revelação da reação foi feita pela adição de 100µl de solução tampão fosfato citrato 0,05M pH 5,8 contendo 0,4mg/ml de orto-fenilenodiamina (OPD) e 0,03% de água oxigenada (H₂O₂), e incubada sob temperatura ambiente e em câmara úmida por 30 minutos. A reação foi interrompida, após 30 minutos, pela adição de ácido clorídrico (HCl) 4N. A leitura das DO foi realizada em leitor automático de microplacas⁹ a 492nm.

4.8.4.1. Estudo da afinidade funcional ou avidéz dos anticorpos IgG anti-Toxoplasma gondii (ELISA-IgG)

Para a obtenção da avidéz a uréia é importante, pois mantém a estabilidade do antígeno, evitando que sofra alterações de superfície, ou seja, removido.

⁹ Labsystems Multiskan MS, tipo 352, número de série 35200. Uniscience®

O teste de ELISA foi realizado como descrito acima, sendo que após a incubação das amostras, a primeira lavagem foi realizada com solução de uréia 6M por cinco minutos.

Para calcular o índice de avidéz restrita à diluição da amostra (Avr) utilizou-se a diluição da amostra que forneceu DO maior e/ou mais próxima a 1,0, sendo então calculada pela relação da DO da diluição da amostra tratada com uréia pela DO da diluição da amostra sem o tratamento com uréia, multiplicando por 100. Valores de Avr maiores que 50% foram considerados de alta avidéz de anticorpos. O cálculo da avidéz restrita a diluição da amostra foi feito a partir da fórmula:

$$\text{Avr} = \frac{\text{DO com uréia}}{\text{DO sem uréia}} \times 100$$

Para calcular a Avt, que é uma medida linearmente relacionada à proporção de anticorpos de alta avidéz, foi utilizada uma rotina de fácil operação dentro do Excel, desenvolvida por Meireles (2005), para permitir a rápida obtenção de valores dos títulos e da Avt a partir dos valores de absorbância no ELISA das diluições das amostras.

A principal característica desta abordagem matemática é que nela estão corrigidas eventuais interferências das inclinações das retas dependentes da resposta dos anticorpos de cada amostra ou do comportamento de cada reação (MEIRELES, 2005).

4.8.5. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*T.gondii* foi realizada segundo metodologia descrita por CAMARGO (1974). As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo chato, perfazendo as diluições 1:16, 1:64 até 1:65536. O mesmo procedimento foi realizado para todos os grupos experimentais. Como segunda parte da técnica utilizou-se conjugados anti-IgM de rato e anti-IgG de rato, marcados com isotiocianato de fluoresceína, diluídos em Azul de Evans a 20mg%, previamente diluída em SST 0,01M pH 7,2 na proporção de 1:5. A leitura das lâminas foi realizada em objetiva de 40x, em

microscópio de fluorescência¹⁰, com sistema de filtros para fluorescência e lâmpada de mercúrio de 100V, considerando-se positiva a maior diluição do soro em que ainda havia fluorescência completa na borda de pelo menos 50% dos taquizoítos. A ausência de fluorescência ou apenas na extremidade dos parasitas foi considerada como reação negativa.

4.9. Bioprova

Metade de cada uma das amostras de cérebro e parte da musculatura colhida das ratas ao final do experimento, foi macerada individualmente e inoculada em camundongos Swiss Webster, albinos, fêmeas, não isogênicos, com idade entre 30 a 60 dias e sorologicamente negativos para *T.gondii*, pela via subcutânea, com volume de 1ml, para tentativa de reisolamento de *T.gondii*. As amostras de cérebro e de musculatura foram inoculadas, separadamente, “*in natura*” e digeridas em solução ácida de pepsina de acordo com o recomendado por Dubey (1998a).

As suspensões foram observadas, entre lâmina e lamínula 24mmx60mm, ao microscópio óptico, sob objetiva de 40x. Quatro camundongos foram inoculados por amostra “*in natura*” e digerida, e observados por período de 60 dias. Os animais que desenvolveram sinais clínicos foram sacrificados, sendo examinado o líquido peritoneal na busca de taquizoítos do agente. Os sobreviventes, aos 60 dias pós-inoculação, tiveram o sangue colhido por punção do seio orbital e, o soro obtido fora examinado pela MAT-AF para pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii*. Foram consideradas positivas as amostras que foram observadas formas parasitárias, no líquido peritoneal ou nos órgãos, ou quando os animais inoculados foram positivos para a MAT-AF.

4.10. Análise estatística

Para efeito de análise, os títulos de anticorpos obtidos pelos diferentes métodos de detecção foram transformados pela conversão em log (10*título). As curvas de anticorpos séricos foram então construídas a partir dos dados transformados, sendo demonstradas como média \pm desvio-padrão dos

¹⁰ Microscópio Zeiss SH250, Zeiss®

títulos transformados. A partir desta curva, para efeito de comparação dos resultados obtidos nos diversos métodos, foi calculada a área sob a curva (ASC), como descrito por Jungersen et al. (2002). Independente do grupo, as ASC dos diferentes métodos de detecção de anticorpos foram comparadas entre si pelo Teste t de Student, no caso da comparação de dois métodos, ou pela Análise de Variância para Experimento Inteiramente Aleatorizado (ANOVA-EIA) com comparação de médias pelo Teste de Tukey, no caso da comparação de mais de dois métodos. A comparação das ASC dos intervalos de semanas, para cada método de detecção utilizado, foi realizada pela Análise de Variância para Grupos Emparelhados, com comparação de médias pelo Teste de Tukey. A taxa de sobrevivência dos camundongos, medida em dias, após a inoculação de tecidos provenientes das ratas foi comparada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, quando comparados tecidos diferentes para um mesmo grupo de ratas, ou pelo método não paramétrico de Mann-Whitney, quando comparados o mesmo tecido proveniente de grupos diferentes de ratas.

*R*ESULTADOS

V - RESULTADOS

5.1. Produção de antígeno

Nem todos os lavados peritoneais submetidos à técnica de centrifugação, puderam ser aproveitados, por apresentarem células, o que comprometeria a separação final pela centrifugação. Por outro lado, todos os lavados submetidos às técnicas de sedimentação espontânea foram aproveitados.

Ao ser observado em microscópio óptico¹¹, objetiva de 20x, o antígeno preparado pela sedimentação espontânea apresentou com dez minutos de sedimentação, taquizoítos e células, grandes e pequenas, nas fases A, B e C (Figura 2). Com 25 minutos, havia taquizoíto e células pequenas nas mesmas fases (Figura 3). Com 40 minutos, observou-se taquizoítos livres, mas com algumas células pequenas ainda presentes na fase C. Porém, com 60 minutos observou-se somente taquizoítos na fase A, e taquizoítos e raras células em B e C. Por outro lado, o sedimento estava repleto somente de células grandes e pequenas (Figura 4).

¹¹ Microscópio JENAMED 2, JENAMED®

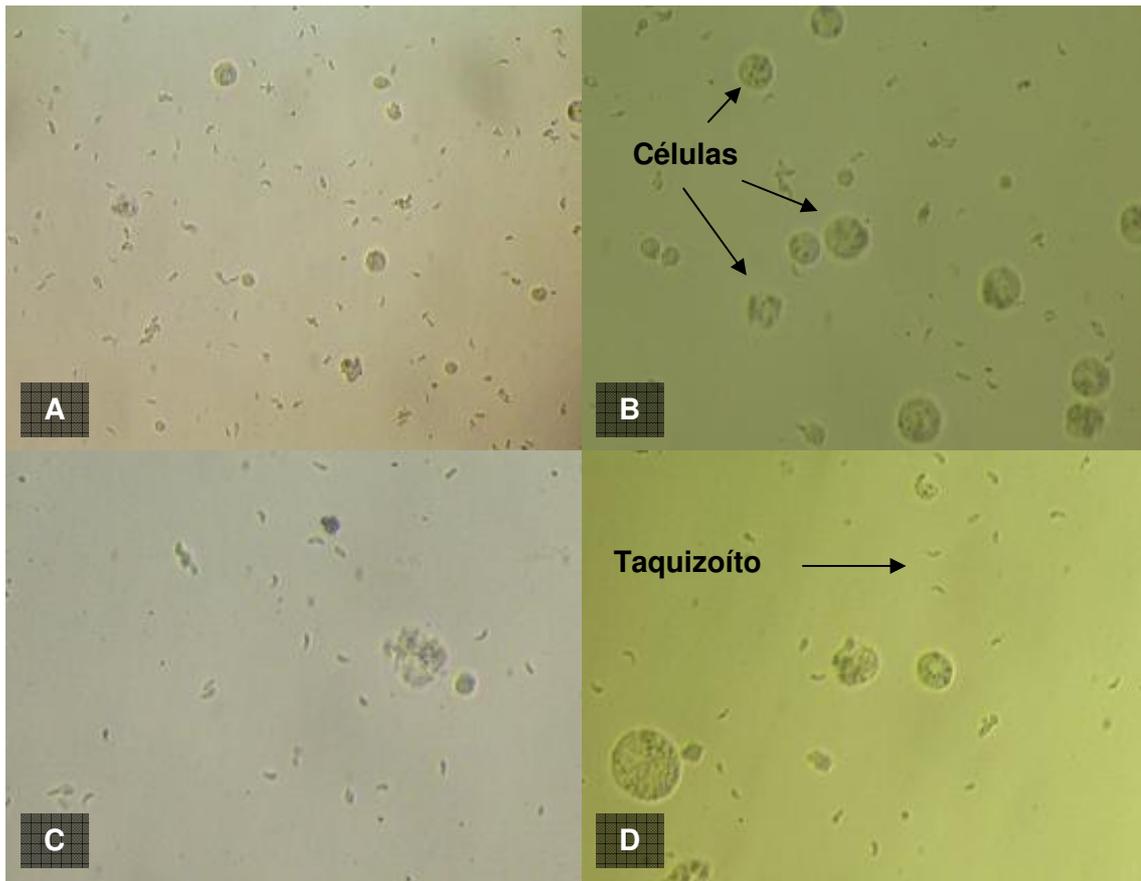


Figura 2 – Técnica de sedimentação espontânea, com análise dez minutos após a colheita do líquido peritoneal. Botucatu, 2006

As letras indicam a profundidade da amostra no tubo. A: fase líquida mais superficial; B: fase líquida intermediária; C: fase líquida mais profunda; D: sedimento. Fase A, rica em taquizoítos com poucas células pequenas. Fases B, C e D, ricas em taquizoítos, e maior quantidade de células.

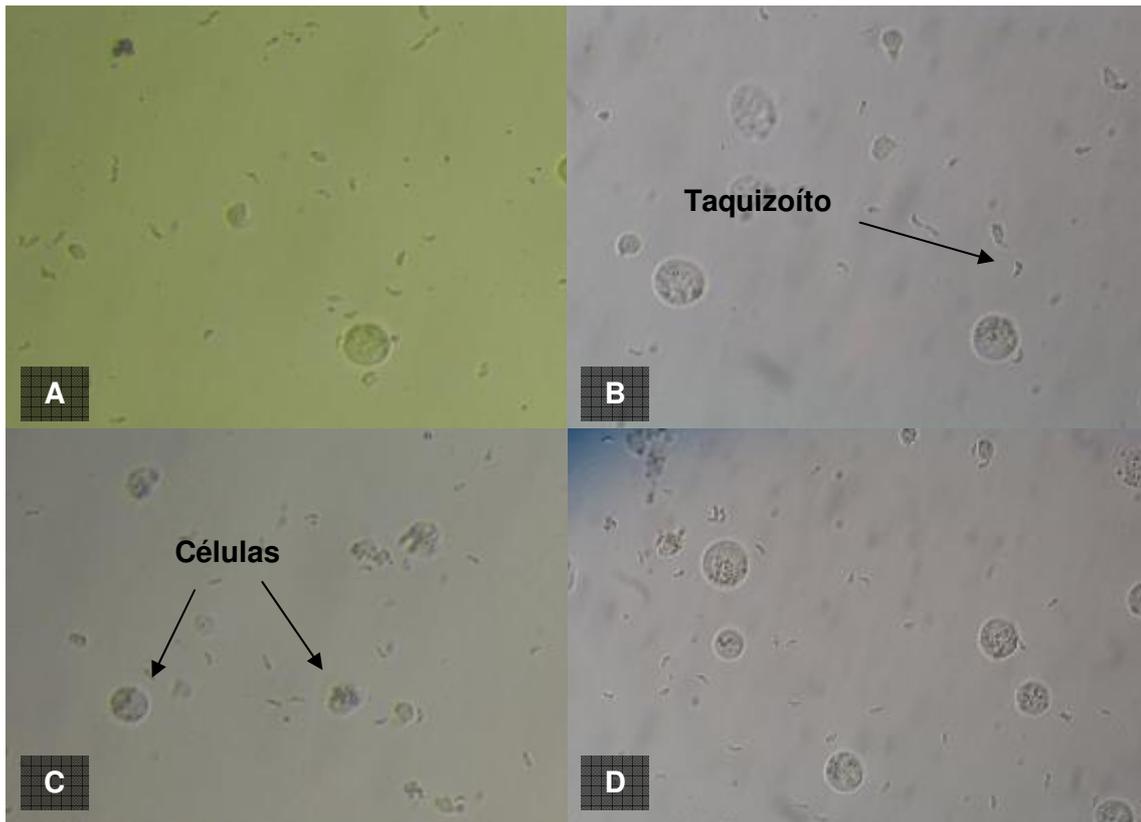


Figura 3 – Técnica de sedimentação espontânea, com análise 25 minutos após a colheita do líquido peritoneal. Botucatu, 2006

As letras indicam a profundidade da amostra no tubo. A: fase líquida mais superficial; B: fase líquida intermediária; C: fase líquida mais profunda; D: sedimento. Fases A e B, com grande concentração de tachizoítos. Fases C e D, a concentração de células é maior.

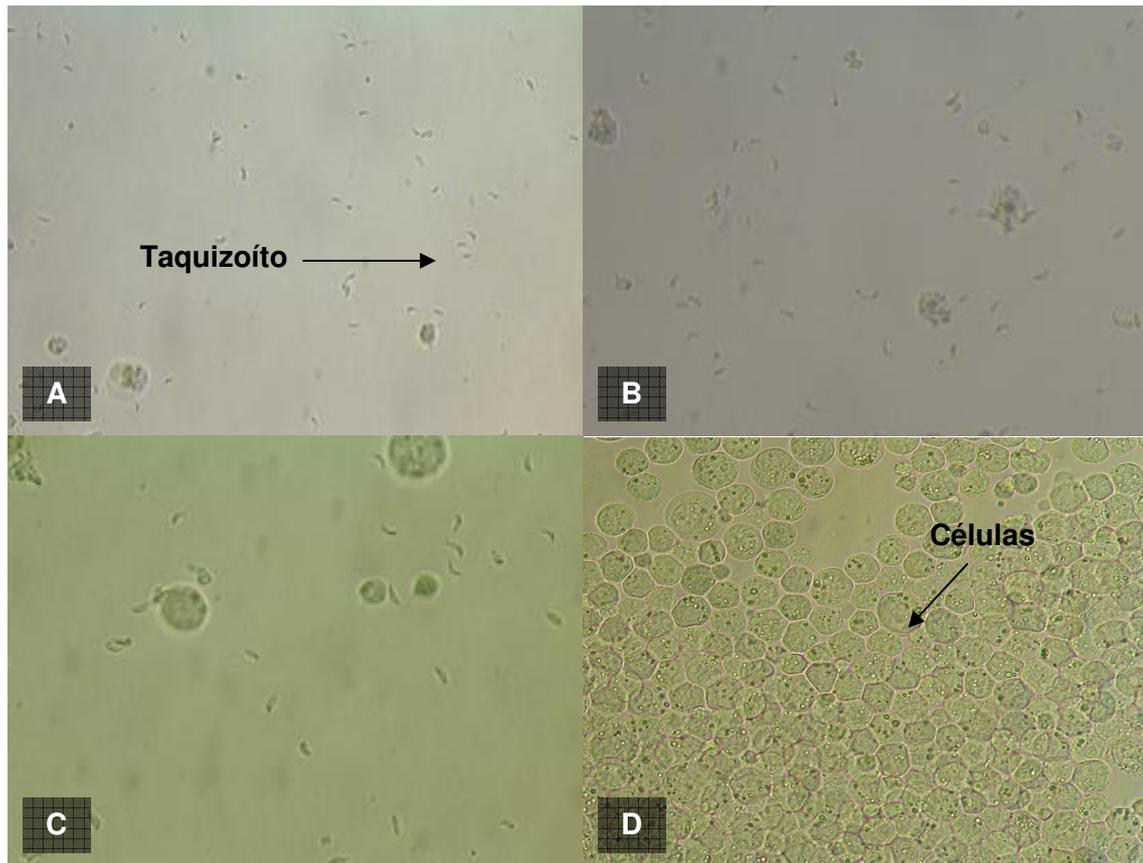


Figura 4 – Técnica de sedimentação espontânea, com análise 60 minutos após a colheita do líquido peritoneal. Botucatu, 2006

As letras indicam a profundidade da amostra no tubo. A: fase líquida mais superficial; B: fase líquida intermediária; C: fase líquida mais profunda; D: sedimento. Na fase A, estão presentes praticamente somente taquizoítos. Nas fases B e C, taquizoítos e raras células estão presentes. Na fase D, somente células pequenas e grandes.

O antígeno submetido à técnica de centrifugação apresentou menor quantidade de taquizoítos que o da sedimentação espontânea, e poucas células pequenas.

Ao se testar o antígeno produzido pela sedimentação espontânea, o soro controle positivo apresentou a formação de uma “malha-de-aglutinação” cobrindo o fundo do poço, e o controle negativo a formação de “botão-de-fundo” (Figura 5 e 6).

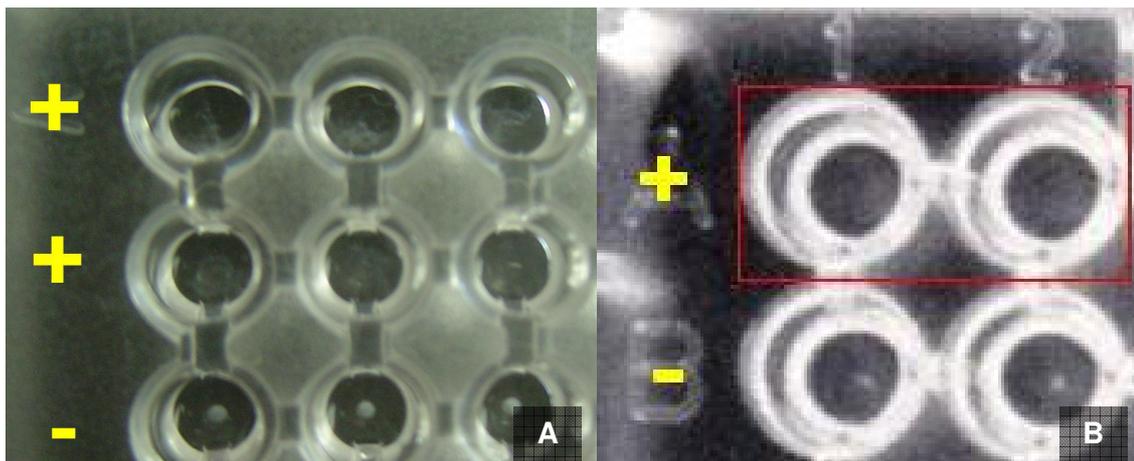


Figura 5 – Avaliação macroscópica de amostras de soro submetidas a técnica de aglutinação direta modificada. Botucatu, 2006

Na figura 5A, três diluições (1:16, 1:64, 1:256) de soros controle positivo e negativo. Observação contra fundo escuro sob iluminação com incidência transversal na placa. Na figura 5B, duas diluições (1:16, 1:64) dos mesmos soros controle positivo e negativo. Observação em transluminador ultravioleta, com filtro de 300nm e fotografado utilizando-se sistema fotográfico Polaroid®.

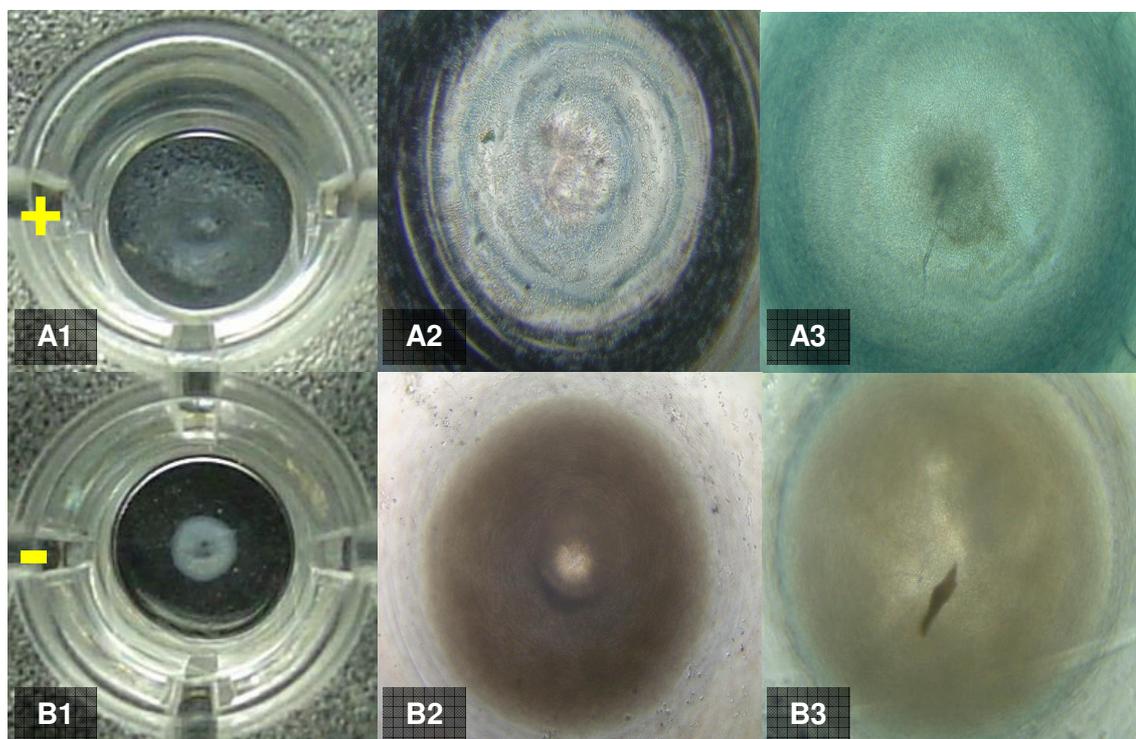


Figura 6 – Avaliação macro e microscópica das reações positivas e negativas pela técnica de aglutinação direta modificada. Botucatu, 2006

Reação positiva, com formação de “malha-de-aglutinação” em 6A, e negativa em 6B. 6A1 e 6B1 (macro), 6A2 e 6B2 (micro, objetiva de 20x) e, 6A3 e 6B3 (micro, objetiva de 40x). 6A2, 6A3, 6B2, 6B3 – observação em microscópio óptico de incidência invertida de luminosidade¹²

5.2. Inativação do antígeno

5.2.1. Acetona

De todos os protocolos testados, aqueles em que, ao final fora ressuspendido com solução tampão borato pH 8,9, imediatamente ou duas semanas após, houve formação de gel com grumos, pela lise do parasita e liberação do DNA, que não se desfaziam mesmo quando submetidos a banho-maria a 56°C ou 72°C, por até 30 minutos. Ao contrário, quando se utilizou solução salina 0,95% para ressuspendir o sedimento, não houve a formação de gel, sendo de fácil homogeneização, sob agitação, permitindo-se assim a realização das provas sorológicas (Figura 7 e 8).

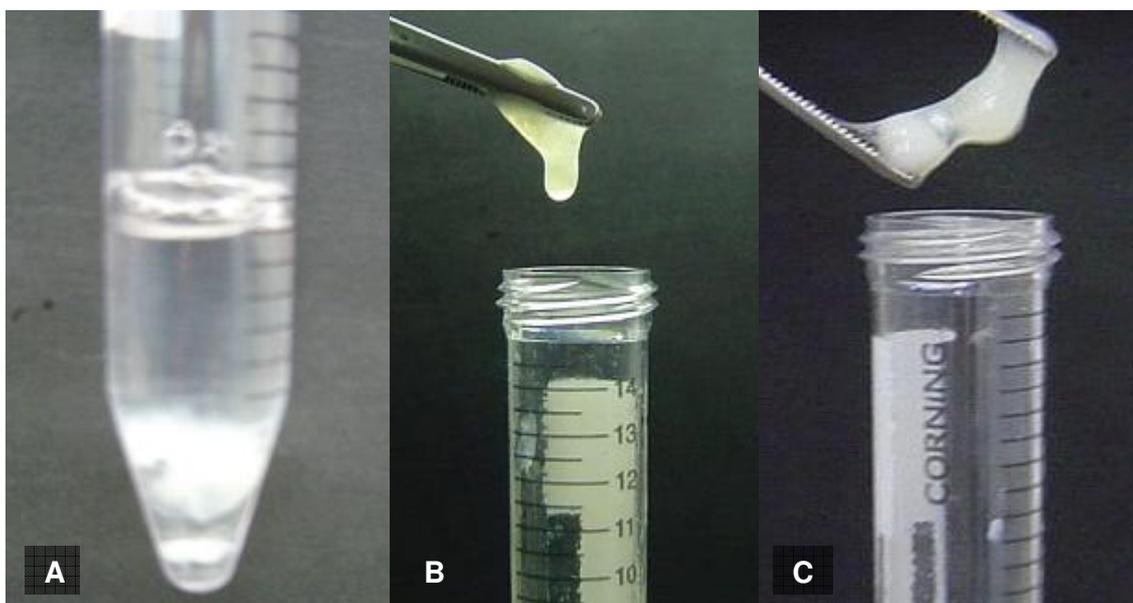


Figura 7 – Características macroscópicas do antígeno inativado com acetona, ressuspendido em tampão borato pH 8,9, após homogeneização (7A). Permaneceu consistente e aderente (7B e 7C). Botucatu, 2006

¹² Microscópio LEICA MPS60, tipo 090-131-002, n° ordem 520803. LEICA®

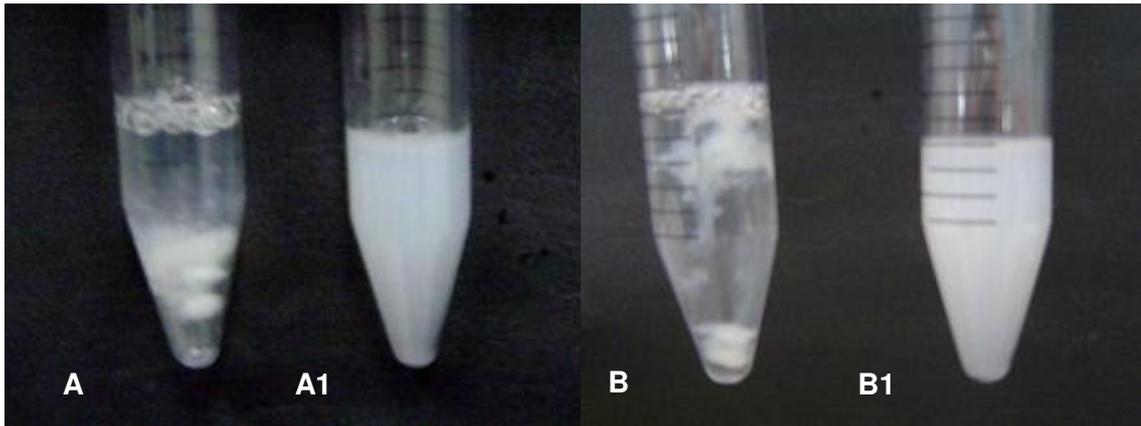


Figura 8 – Avaliação macroscópica dos sedimentos inativados pela acetona. Botucatu, 2006

Figuras 8A e 8A1 (protocolos 5 e 6) e, 8B e 8B1 (protocolos 7 e 8). Os sedimentos dos tubos 8A e 8B foram ressuspensos em tampão borato pH 8,9, e 8A1 e 8B1 em solução salina 0,95%. Em 8A e 8B, houve a formação de gel, e em 8A1 e 8B1, permaneceram homogêneos.

As amostras de soro controle positivo e negativo foram testadas incubando-se por 24 ou 48 horas, sob temperatura ambiente ou de estufa a 37°C. Todos os resultados foram negativos, revelando a formação do “botão-de-fundo”, característico de negatividade da prova.

5.2.2. Metanol

A inativação com metanol foi mais prática. A solução SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1% foi fundamental para as lavagens do antígeno, provavelmente por manter a integridade das membranas do parasita e permitir a remoção da tripsina e heparina remanescente.

Durante todo o período de incubação do antígeno em metanol, não houve a formação de grumos e de gel. Isto mostra que o metanol estaria agindo sobre o antígeno, inativando-o, e permitindo a expressão dos marcadores antigênicos específicos da fase aguda da infecção.

Ao proceder os lavados do antígeno, em SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1%, observou-se que não ocorreu a formação de grumos, nem de gel. Microscopicamente, os taquizoítos se apresentaram inativos e íntegros, não se notando nenhuma alteração após 30 dias (Figura 9).



Figura 9 – Tubo de centrífuga contendo o antígeno inativado com metanol. Fácil homogeneização, sem formação de grumos e gel. Botucatu, 2006

5.3. Padronização da concentração do extrato antigênico solúvel, do conjugado e da avidina para o ELISA

Das concentrações de extrato antigênico solúvel testadas, melhores resultados discriminatórios foram obtidos com a utilização de 1µg/ml de antígeno, frente aos soros controles positivos e negativos, como descrito no item 4.3.3.1.

O título de 10.000 para o conjugado anti-IgG de rato, e de 5.000 para avidina conjugada a peroxidase, apresentaram os melhores resultados, quando submetidos a uma concentração de 1µg/ml de extrato antigênico solúvel, permitindo a sua utilização sem risco de apresentar resultados que excedessem os valores limites de absorvância para a prova de ELISA. Além disso, permitiu uma perfeita diferenciação entre os soros tratados e não tratados com uréia 8M (Gráfico 1).

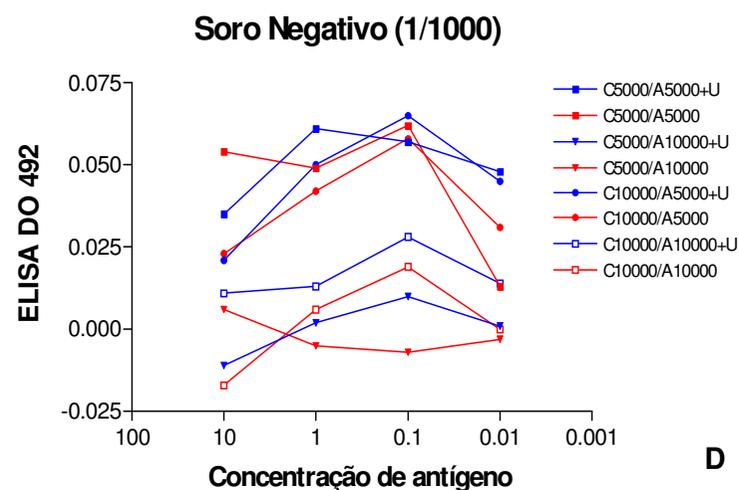
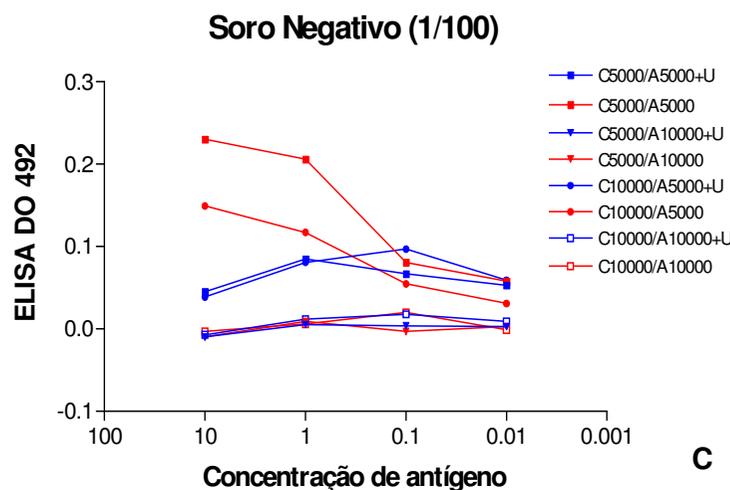
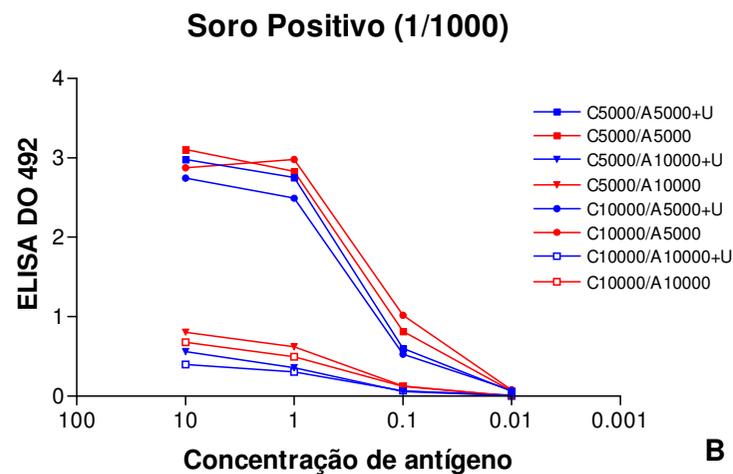
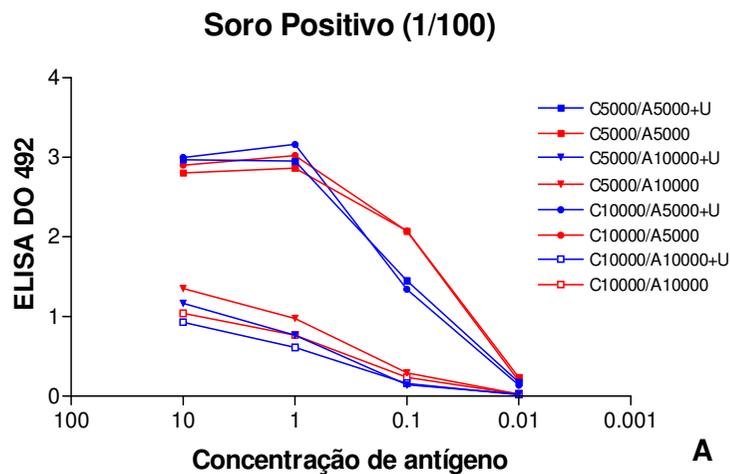


Gráfico 1 – Padronização da concentração de antígeno, conjugado anti-IgG de rato e avidina, para ELISA. Botucatu, 2006

5.4. Provas sorológicas

5.4.1. Grupo experimental infectado, não imunodeprimido (G1)

A partir dos valores obtidos pela conversão dos valores originais, têm-se os Gráficos 2A-F, permitindo uma visualização da distribuição dos dados, resumindo-se graficamente os mesmos, indicando a média do log dos títulos de cada grupo experimental, nos diferentes momentos de obtenção das amostras. As Tabelas 1 a 3, expressam comparativamente as médias de títulos de anticorpos obtidas pelas provas sorológicas, durante o período analisado.

No G1, os títulos de IgM foram detectáveis já nos primeiros sete dias, sendo que na segunda semana, apesar de presentes, os títulos de IgM foram superiores ou iguais aos títulos de IgG, para MAT-AM e RIFI-IgG, porém inferiores aos da MAT-AF. Os títulos de IgM atingiram pico na terceira semana, que se manteve até a sexta semana quando passaram a diminuir, contrastando com títulos bem maiores de IgG, para a MAT-AF e RIFI-IgG.

A MAT-AF e a MAT-AM detectaram anticorpos a partir da segunda semana. Apresentaram considerável diferença de títulos sorológicos principalmente no período compreendido entre a quarta e a décima primeira semana. Isto caracterizou a detecção diferencial de IgGs, onde somente as de fase aguda foram detectadas pela MAT-AM. A MAT-AM detectou pico de IgG entre a quarta e quinta semana, a MAT-AF detectou na sexta semana, enquanto a RIFI-IgG detectou na quinta semana, e a RIFI-IgM, pico de IgM entre a segunda e a quinta semana. A técnica de ELISA-IgG se mostrou a mais sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos IgG anti-*T.gondii* a partir da primeira semana para três animais, além de já apresentarem uma baixa avidéz restrita. Pelo ELISA IgG avidéz detectou-se pico inicial de títulos de anticorpos IgG na quarta semana, seguido de uma queda na quinta semana, e ascensão da sexta até a décima semana, com queda gradativa após este período até manter-se estável (Gráficos 2 e 3). A avidéz expressa pela Avt e Avr, aumentou gradativamente com o período da infecção, caracterizando a maturação das imunoglobulinas G, chegando a uma Avt de 47,2% para um dos animais na 11^a semana, com queda nas duas últimas semanas. Interferências das variações das diluições do soro promoveram interferência na análise da Avr, permitindo que estas apresentassem valores maiores que a Avt.

No Gráfico 2A, observa-se que os dois tipos de aglutinação dão resultados iguais até a segunda semana, quando os valores da MAT-AM tornam-se paulatinamente menores que os valores da MAT-AF. Além disso, já na sexta semana os títulos da MAT-AM estabilizam-se, enquanto que os da MAT-AF parecem estabilizar-se apenas a partir da 12^a ou 13^a semana.

No Gráfico 2B, títulos totais já são detectados na primeira semana pelo ELISA, mantendo-se o mesmo comportamento das curvas sorológicas para os títulos do ELISA e do ELISA de avides, que após um pico detectável na quarta semana, e queda na semana seguinte, pareceram estabilizar a partir a sexta semana. Os valores da avides do ELISA, desde o início da análise sempre foram menores que os valores totais do ELISA.

Títulos de IgM foram detectados logo na primeira semana, quando títulos de IgG ainda não eram mensuráveis, pela RIFI (Gráfico 2C). Ainda na segunda semana, quando IgG já aparecia, os títulos de IgM ainda eram superiores, a partir de quando se estabilizaram até a oitava semana, apresentando uma leve queda até a 13^a semana. Os títulos de IgG superaram os de IgM somente na quarta semana, se estabilizando a partir da sexta semana.

As comparações entre as provas sorológicas, para o referido grupo, demonstraram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias das áreas de títulos de anticorpos detectados pela MAT-AM e MAT-AF. Além disso, MAT-AF também diferiu significativamente da RIFI-IgG, que não diferiu da RIFI-IgM. Na análise da MAT-AF com as RIFIs, a primeira se mostrou mais sensível e diferiu das RIFIs com uma média de 3,91, comparada a 3,23 (RIFI-IgG) e 2,94 (RIFI-IgM). MAT-AM também diferiu significativamente da RIFI-IgG, com uma média menor de anticorpos detectada.

Tabela 1 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AF x MAT-AM x RIFI-IgG), para o G1. Botucatu, 2006

Métodos	Média ± Desvio-padrão
MAT-AF	3,91 ^A ± 0,33
MAT-AM	2,96 ^B ± 0,26
RIFI-IgG	3,23 ^B ± 3,78
Estatística F	10,82
Valor de P	0,0040

Estatística: médias de áreas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes pela Análise de Variância, comparados pelo Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%.

Tabela 2 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AF x RIFI-IgG x RIFI-IgM), para o G1. Botucatu, 2006

Métodos	Média ± Desvio-padrão
MAT-AF	3,91 ^A ± 0,33
RIFI-IgG	3,23 ^B ± 3,78
RIFI-IgM	2,94 ^B ± 0,35
Estatística F	9,27
Valor de P	0,0065

Estatística: médias de áreas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes pela Análise de Variância, comparados pelo Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%.

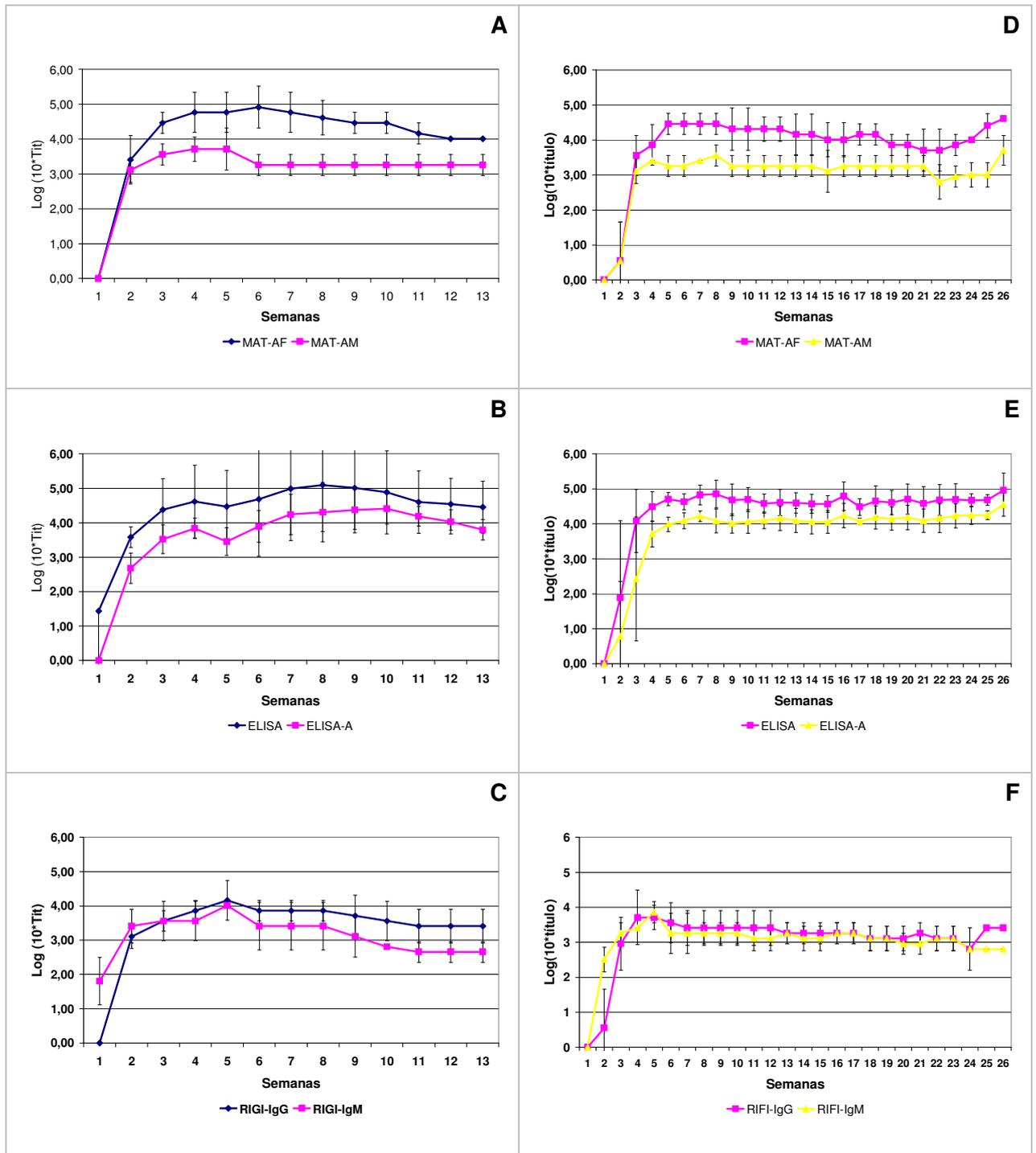


Gráfico 2 – Variação semanal da concentração de anticorpos séricos anti-*Toxoplasma gondii* em ratas experimentalmente infectadas. Botucatu, 2006

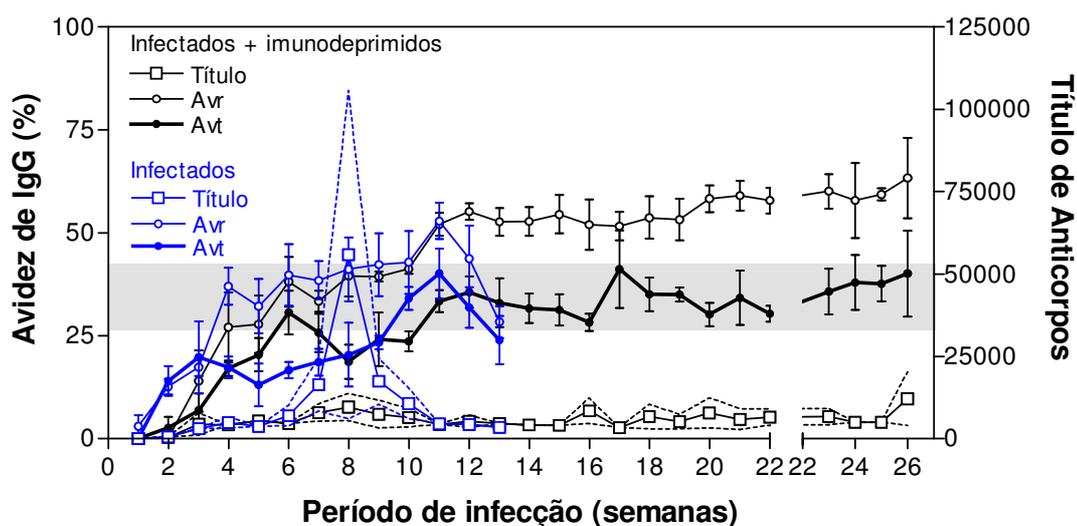
A, B e C: resultados da MAT-AF & MAT-AM, ELISA & ELISA avides, RIFI-IgG & RIFI-IgM para ratas infectadas com a cepa BTU10; D, E e F: resultados da MAT-AF & MAT-AM, ELISA & ELISA avides, RIFI-IgG & RIFI-IgM para ratas infectadas com a cepa BTU10 e imunodeprimidas a partir da 22ª semana pós-infecção.

Tabela 3 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AM x RIFI-IgG), para o G1. Botucatu, 2006

Métodos	Média ± Desvio-padrão
MAT-AM	2,96 ^A ± 0,26
RIFI-IgG	3,23 ^B ± 3,78
Estatística t	7,35
Valor de P	0,0052

Estatística: médias de áreas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes pelo teste t de Student, considerando-se um nível de significância de 5%.

Título, Avt e Avr



|| - Início da imunodepressão

■ - Zona de maior frequência de pontos reagentes

Gráfico 3 – Comparação dos títulos, índices de avididade pelo título de anticorpos (Avt) e de avididade restrita (Avr) entre os grupos experimentais 1 e 2, e a cinética dos anticorpos durante o período experimental analisado. Botucatu, 2006

5.4.2. Grupo experimental infectado e imunodeprimido (G2)

As Tabelas 4 a 6, expressam comparativamente as médias de títulos de anticorpos obtidas pelas provas sorológicas, durante o período analisado.

A partir das curvas obtidas no Gráfico 2, foi possível calcular a área da curva e comparar a mesma para cada teste de detecção de anticorpos, nos intervalos, principalmente nos que antecederam (17^a a 21^a semanas) e acompanharam (22^a a 26^a semanas) o protocolo de imunodepressão. Os resultados desta análise comparativa entre as provas sorológicas utilizadas e os diferentes momentos do experimento podem ser verificados na Tabela 8. Os dados nesta tabela não refletem a área “real”, mas sim a área corrigida para o número de determinações realizadas, uma vez que alguns animais não tiveram o segmento completo, ou seja, não foram avaliados até a 26^a semana.

No G2, os títulos de IgM foram detectáveis somente na segunda semana, sendo que um dos animais, nesta mesma semana, começou apresentar título baixo de IgG para RIFI-IgG, e para a MAT-AF e MAT-AM, o título era 256. Somente um animal apresentava títulos de IgG para RIFI e MAT na segunda semana, enquanto que para o ELISA, em dois animais já eram detectáveis níveis de anticorpos, porém avides não. Os títulos de IgM passaram a declinar após a décima semana contrastando com títulos maiores de IgG, para a MAT-AF. A MAT-AF e a MAT-AM apresentaram considerável diferença de títulos sorológicos principalmente no período compreendido entre a quarta e a décima oitava semana. A MAT-AM detectou um pico de IgG entre a sétima e oitava semana, a MAT-AF detectou entre a quarta e a oitava semana, enquanto a RIFI-IgG detectou entre a quarta e a quinta semana, e a RIFI-IgM, picos de IgM entre a terceira e quinta semana. Pelo ELISA-IgG, detectou-se um primeiro pico de títulos de anticorpos IgG anti-*T.gondii* entre a sexta e nona semana, e um segundo entre a 15^a e 17^a semana. Após a 22^a semana, com o início do protocolo de imunodepressão, observou-se queda acentuada dos títulos de anticorpos somente para duas das ratas, com a morte de um dos animais logo após a primeira semana. A avides, após o início da imunodepressão, não sofreu interferência e, portanto, não diminuiu se mantendo em freqüente ascensão (Gráficos 2 e 3).

No Gráfico 3, a Avt manteve-se uma freqüente elevação, até a 16^a semana, com a maturação gradativa das imunoglobulinas, se estabilizando a

partir da 17^a semana, diferentemente da Avr, que se estabilizou a partir da 12^a semana, com uma discreta elevação a partir da 19^a semana. Avt manteve menores valores principalmente devido as interferências das variações das diluições obtidas nos dados da Avr. Ambas não sofreram interferência da imunodepressão. Porém, a partir desta, verificou-se que a ascensão na curva de maturação dos anticorpos não fora acompanhada pelos títulos, onde estes atingiram picos entre a oitava e décima semana, seguidos de queda e estabilização até o período final da análise do experimento.

No Gráfico 2D, observa-se que a cinética de anticorpos se comportou igualmente para o G1, independentemente da extensão do período analisado. Porém, uma aparente queda de títulos tanto para os valores da MAT-AM como para os de MAT-AF na 22^a semana, quando iniciou-se o protocolo de imunodepressão, e conseqüente ascensão na 25^a semana até a morte dos animais.

No Gráfico 2E, os títulos são detectáveis somente a partir da segunda semana, porém verifica-se que os anticorpos se comportam assim como no G1, onde os títulos do ELISA de avidéz acompanham os do ELISA por todo o período experimental, sempre com valores menores. Os títulos apresentam-se em ascensão até a quarta-semana, quando estabilizam-se até o final do experimento. Frente a imunodepressão, na 22^a semana, não observa-se qualquer alteração na curva, apresentado discreta elevação de títulos na 26^a semana.

Tanto a RIFI-IgM e RIFI-IgG detectaram anticorpos somente na segunda semana, sendo que os título de IgM foram maiores até a terceira semana, porém somente na quarta semana os títulos de IgG foram superiores aos de IgM. A partir da quinta semana, os títulos se mantiveram estáveis e próximos até a 23^a semana, quando após a imunodepressão houve elevação dos títulos de IgG (Gráfico 2F).

As comparações entre as provas sorológicas, para o referido grupo, demonstrou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias das áreas de títulos de anticorpos detectados pela MAT-AM e MAT-AF. A MAT-AF também diferiu significativamente da RIFI-IgG ($P < 0,05$), que não diferiu da RIFI-IgM. Na análise da MAT-AF com as RIFIs, a primeira se mostrou mais sensível e diferiu das RIFIs com uma média de 3,73, comparada a 2,99 (RIFI-IgG) e 2,96 (RIFI-

IgM). Para este grupo experimental, a MAT-AM não apresentou diferença significativa da RIFI-IgG ($P > 0,05$).

Na Tabela 7, pode-se observar diferença significativa ($P < 0,05$) no período estudado para todas as provas sorológicas com exceção da RIFI-IgM, com as amostras de soro do G2. Principal diferença foi observada entre a 1ª e 6ª semanas e da 7ª e 11ª semanas para as MATs e para os ELISAs. O ELISA avidéz apresentou diferença em todos os períodos analisados, com um pico no período prévio (17ª a 21ª semanas) à imundepressão (22ª a 26ª semanas), sendo observado também pela RIFI-IgG (3,15). Tanto a MAT-AM como a MAT-AF, apresentaram picos das áreas das curvas entre a 7ª e 11ª semanas (2,68 e 3,49, respectivamente).

A cinética dos títulos e avidéz de anticorpos IgG pelo ELISA de todos animais infectados, referentes aos grupos 1 e 2, pode ser observada no Gráfico 3.

Tabela 4 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AF x MAT-AM x RIFI-IgG), para o G2. Botucatu, 2006

Métodos	Média ± Desvio-padrão
MAT-AF	3,73 ^A ± 0,29
MAT-AM	2,93 ^B ± 0,22
RIFI-IgG	2,99 ^B ± 0,33
Estatística F	9,70
Valor de P	0,0057

Estatística: médias de áreas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes pela Análise de Variância, comparados pelo Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%.

Tabela 5 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AF x RIFI-IgG x RIFI-IgM), para o G2. Botucatu, 2006

Métodos	Média ± Desvio-padrão
MAT-AF	3,73 ^A ± 0,29
RIFI-IgG	2,99 ^B ± 0,33
RIFI-IgM	2,96 ^B ± 0,19
Estatística F	9,93
Valor de P	0,0053

Estatística: médias de áreas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes pela Análise de Variância, comparados pelo Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%.

Tabela 6 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos (MAT-AM x RIFI-IgG), para o G2. Botucatu, 2006

Métodos	Média ± Desvio-padrão
MAT-AM	2,93 ^A ± 0,22
RIFI-IgG	2,99 ^A ± 0,33
Estatística t	0,96
Valor de P	0,4070

Estatística: médias de áreas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes pelo teste t de Student, considerando-se um nível de significância de 5%.

Tabela 7 – Comparação entre as áreas da curva da concentração de anticorpos, em diferentes intervalos, nos animais submetidos ao protocolo de imunodepressão, segundo o método de detecção de anticorpos utilizado. Botucatu, 2006

Método	Períodos / Média ± desvio-padrão da área da curva					Estatística F	Valor de P
	1 ^a a 6 ^a semanas	7 ^a a 11 ^a semanas	12 ^a a 16 ^a semanas	17 ^a a 21 ^a semanas	22 ^a a 26 ^a semanas		
MAT-AF	2,44 ^A ± 0,34	3,49 ^B ± 0,35	3,30 ^B ± 0,39	3,16 ^{AB} ± 0,23	2,88 ^{AB} ± 0,59	1,7140	0,0146
MAT-AM	1,99 ^A ± 0,26	2,68 ^B ± 0,18	2,58 ^{AB} ± 0,30	2,61 ^{AB} ± 0,24	2,15 ^{AB} ± 0,51	1,4160	0,0156
ELISA	2,91 ^A ± 0,42	3,79 ^B ± 0,21	3,69 ^{AB} ± 0,21	3,70 ^{AB} ± 0,29	3,37 ^{AB} ± 0,66	1,1460	0,0447
ELISA avidéz	2,16 ^A ± 0,58	3,26 ^B ± 0,21	3,28 ^B ± 0,26	3,32 ^B ± 0,23	3,04 ^B ± 0,58	2,2480	0,0035
RIFI-IgG	2,12 ^A ± 0,45	2,73 ^{AB} ± 0,39	2,62 ^{AB} ± 0,25	3,15 ^B ± 0,28	2,22 ^A ± 0,55	4,1360	0,0038
RIFI-IgM	2,44 ^A ± 0,13	2,59 ^A ± 0,24	2,53 ^A ± 0,24	2,46 ^A ± 0,21	2,12 ^A ± 0,31	1,7830	0,0719

Estatística: valores de P menores que 0,05 indicam diferenças significativas entre as curvas de concentração de anticorpos nos intervalos estudados, pela Análise de Variância para amostras dependentes, comparados pelo Teste de Tukey – valores de médias seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos, para um mesmo teste de detecção de anticorpos, considerando-se um nível de significância de 5%.

5.4.3. Grupo experimental não infectado (G3)

Todos os animais se apresentaram sorologicamente negativos durante todo o período de experimentação.

5.5. Bioprova

5.5.1. Grupo experimental infectado, não imunodeprimido (G1)

Os resultados do período de sobrevivência dos camundongos inoculados com musculatura ou cérebro, digerido ou não, das ratas pertencentes ao grupo G1 estão expressos nas Tabelas 8, 9 e 12.

As ratas inoculadas com a cepa BTU10 de *T.gondii* sobreviveram durante o período experimental de 90 DPI, sendo submetidas a colheitas de sangue semanalmente, sem a manifestação de sinais clínicos.

Os camundongos com 40 dias de idade foram divididos em grupos assim caracterizados: musculatura “*in natura*” (G1-MIN) e digerida (G1-MD) com pepsina; cérebro “*in natura*” (G1-CIN) e digerido (G1-CD).

O período de sobrevivência dos animais inoculados com material proveniente da musculatura das ratas infectadas foi maior comparando-se com os resultados obtidos dos animais inoculados com cérebro (Figura 10), porém sem diferença significativa ($P>0,05$). Para a bioprova do material cerebral, os animais inoculados com material das ratas 1 e 3 apresentaram período de sobrevivência igual, diferentemente dos animais inoculados com material da rata 2, com uma média de 26,50 dias, e da rata 4, com 8 dias. Com relação ao material da musculatura, ocorreu uma maior regularidade, com um período de sobrevivência máximo médio de 22,25 dias para o material da rata 1, e mínimo de 13,25 dias no caso da rata 4.

Verificou-se que o período de sobrevivência dos camundongos inoculados com material cerebral, não diferiu significativamente ($P>0,05$), entre os grupos, mas quando se estudou a musculatura, observou-se diferença significativa ($P<0,05$) entre os mesmos, sendo em G2, de 9,75 dias e, em G1, de 18,00 dias (Tabela 12). Quando se analisaram os grupos isoladamente, não se observou diferença significativa ($P<0,05$) quando os diferentes tecidos para o G1.

Tabela 8 – Camundongas referentes a prova biológica do grupo G1-CIN das ratas infectadas não imunodeprimidas. Botucatu, 2006

	Rata 1*	Rata 2*	Rata 3*	Rata 4*	Final*
Camundonga 1	11	27	11	7	
Camundonga 2	11	25	11	8	
Camundonga 3	11	28	11	8	
Camundonga 4	11	26	11	9	
Média	11,00	26,50	11,00	8,00	14,13
Mediana	11,00	26,50	11,00	8,00	14,13

* Período, em dias, de morte dos animais.

Tabela 9 – Camundongas referentes a prova biológica do grupo G1-MIN das ratas infectadas não imunodeprimidas. Botucatu, 2006

	Rata 1*	Rata 2*	Rata 3*	Rata 4*	Final*
Camundonga 1	21	11	12	7	
Camundonga 2	19	27	10	7	
Camundonga 3	20	30	11	13	
Camundonga 4	29	18	27	26	
Média	22,25	21,50	15,00	13,25	18,00
Mediana	20,50	22,50	11,50	10,00	16,12

* Período, em dias, de morte dos animais.

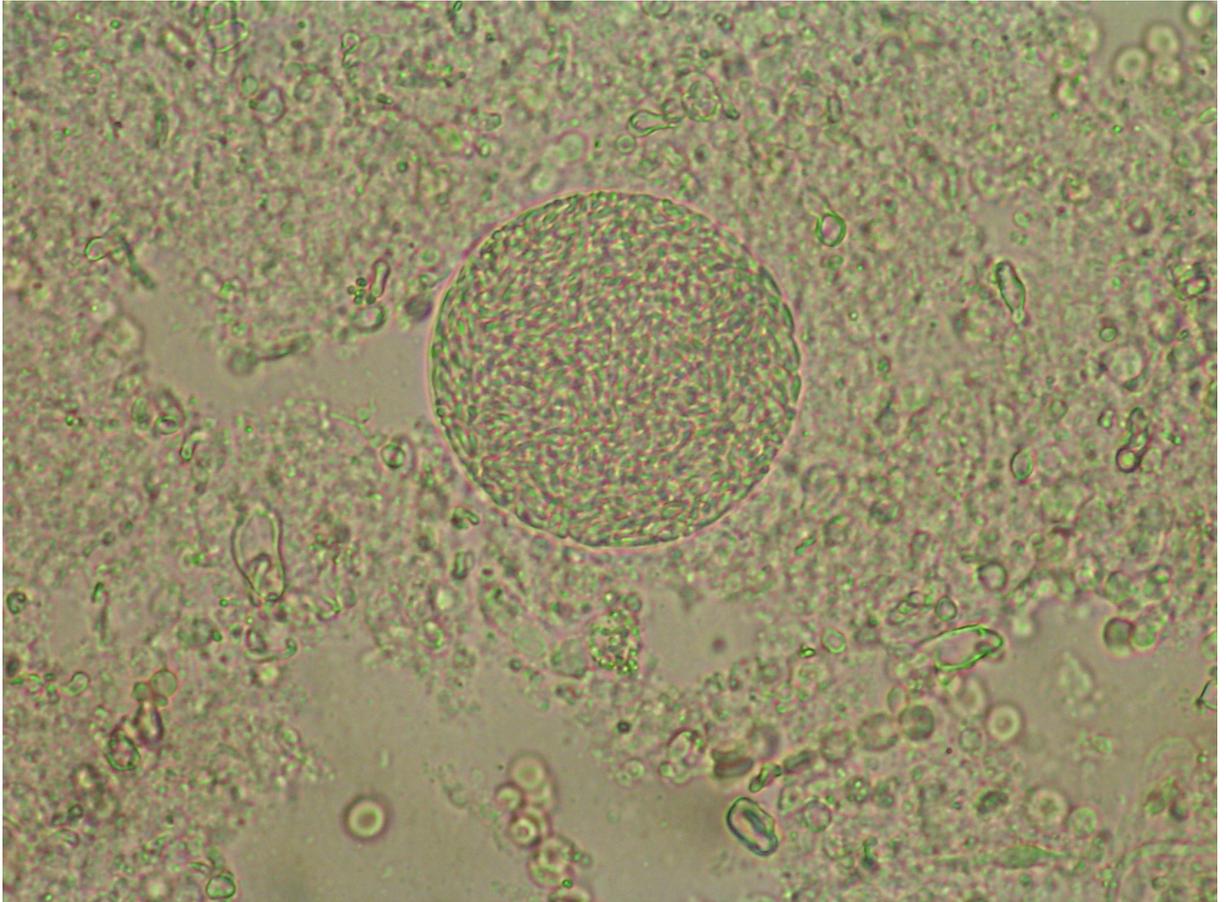


Figura 10 – Cisto tecidual encontrado no cérebro de ratas do grupo G1, após o período de 90 dias de infecção experimental pela cepa BTU10 (Microscópio JENAMED 2, objetiva de 40x). Botucatu, 2006

5.5.2. Grupo experimental infectado e imunodeprimido (G2)

Os resultados do período de sobrevivência dos camundongos inoculados com musculatura ou cérebros, crus ou digeridos, das ratas pertencentes a G2 estão expressos nas Tabelas 10 a 12, e Gráfico 4.

Verificou-se que as ratas infectadas e imunodeprimidas morreram com uma média de 24,75 dias e mediana de 29 dias, pós-imunodepressão. A imunodepressão iniciou com 155 dias pós-infecção. Exceto uma rata que morreu com 10 dias, as demais apresentaram o dorso arqueado, flanco retraído e arrepiamento dorsal e periorbital de pêlos 15 dias pós-imunodepressão.

Os camundongos com 40 dias de idade foram divididos em grupos assim caracterizados: musculatura “in natura” (G2-MIN) e digerida (G2-MD) com pepsina; cérebro “in natura” (G2-CIN) e digerido (G2-CD).

O período de sobrevivência dos animais inoculados com material da musculatura das ratas infectadas foi menor comparado com os animais inoculados com material cerebral, havendo diferença significativa ($P < 0,05$). No caso do material cerebral, a maioria dos animais veio a óbito no 14º DPI, com maior regularidade no período das mortes, com uma média de 12,13 dias. No caso da musculatura, a maioria dos animais inoculados com material da rata 1 morreram no 3º DPI, ao contrário dos demais que morreram entre o 10º e 14º DPI. Exceto o material da rata 1, que apresentou período médio de sobrevivência de 9,75, nos demais casos esse período foi superior a 10 dias.

Na Tabela 12 verifica-se que o período de sobrevivência dos camundongos inoculados com material cerebral, não diferiu significativamente ($P > 0,05$), entre os grupos, mas quando se estudou a musculatura, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre os mesmos, sendo em G2, de 9,75 dias e, em G1, de 18,00 dias. Quando se analisaram os grupos isoladamente, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) somente no G2, onde a bioprova com material cerebral apresenta período de sobrevivência médio de 12,13 dias, e de 9,75 dias para o material de musculatura. Estes dados podem ser visualizados no Gráfico 4.

Tabela 10 – Camundongas referentes a prova biológica do grupo G2-CIN das ratas infectadas e imunodeprimidas. Botucatu, 2006

	Rata 1*	Rata 2*	Rata 3*	Rata 4*	Final*
Camundonga 1	10	13	8	14	
Camundonga 2	10	14	8	14	
Camundonga 3	14	14	10	14	
Camundonga 4	15	13	10	13	
Média	12,25	13,50	9,00	13,75	12,13
Mediana	12,00	13,50	9,00	14,00	12,13

* Período, em dias, dos animais pós-imunodepressão

Tabela 11 – Camundongas referentes a prova biológica do grupo G2-MIN das ratas infectadas e imunodeprimidas. Botucatu, 2006

	Rata 1*	Rata 2*	Rata 3*	Rata 4*	Final*
Camundonga 1	3	11	7	11	
Camundonga 2	3	13	10	11	
Camundonga 3	3	13	10	11	
Camundonga 4	12	14	13	11	
Média	5,25	12,75	10,00	11,00	9,75
Mediana	3,00	13,00	10,00	11,00	9,25

* Período, em dias, de morte dos animais pós-imunodepressão

Tabela 12 – Média \pm desvio-padrão da sobrevivência de camundongos inoculados com amostras de cérebro ou músculo, proveniente de ratas submetidas ou não ao protocolo de imunodepressão. Botucatu, 2006

	Tecido		Estatística	Valor de P
	Cérebro	Músculo		
Ratas imunodeprimidas	12,13 ^{Aa} \pm 2,36	9,75 ^{Ba} \pm 3,71	W = 83,00	0,0151
Ratas não imunodeprimidas	14,13 ^{Aa} \pm 7,52	18,00 ^{Ab} \pm 8,04	W = -59,00	0,0676
Estatística	U = 116,00	U = 58,00		
Valor de P	0,6646	0,0088		

Estatística: Para um mesmo grupo de ratas, médias de sobrevivência seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tecidos, pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, enquanto que para um mesmo tecido, médias de sobrevivência seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos de ratas, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, considerando-se um nível de significância de 5%.

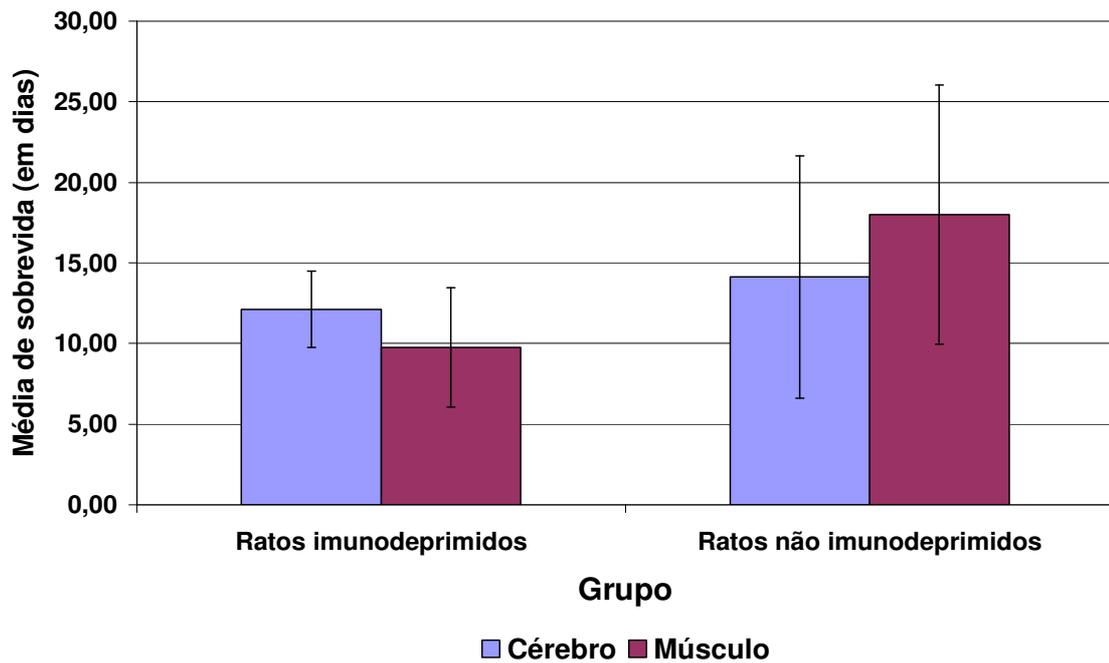


Gráfico 4 – Média \pm desvio-padrão da sobrevivência de camundongos inoculados com amostras de cérebro ou músculo, proveniente de ratas submetidas ou não ao protocolo de imunodepressão. Botucatu, 2006

5.5.3. Grupo experimental não infectado (G3)

As ratas do grupo G3, inoculadas com solução salina 0,95% estéril, permaneceram sob avaliação pelo período proposto de 90 dias, sem a manifestação de nenhum sinal clínico, sendo submetidas a colheitas de sangue semanalmente. Todos foram soronegativos, confirmando a ausência da infecção.

*D*ISSCUSSÃO

VI – DISCUSSÃO

6.1. Produção de antígeno

Baseando-se na fisiopatologia do *T.gondii*, parasita intracelular obrigatório, a utilização de células sarcomatosas para permitir a produção de grande quantidade de antígeno, é um fato importante na obtenção de antígeno concentrado. Porém, observou-se que mesmo com uma grande concentração de taquizoítos de *T.gondii* obtida a partir da utilização de células sarcomatosas e taquizoítos, uma grande quantidade de taquizoítos era desprezada no momento da separação do antígeno e células.

Desmonts & Remington (1980) indicaram a utilização de tripsina para o rompimento de células e liberação de taquizoítos remanescentes, porém os taquizoítos livres poderiam sofrer danos, dependendo do tempo de exposição, pela sensibilidade à tripsina, diferentemente dos bradizoítos. Este fato poderia comprometer na concentração final do antígeno. A tripsina, independentemente do tempo de exposição, pode interferir na conformação dos determinantes antigênicos, e das proteínas de superfície de membrana do taquizoíto, além da fixação do antígeno nas lâminas, fatores que podem alterar a sensibilidade e especificidade da prova.

Uma célula pode albergar de 13 a 15 taquizoítos, e quando é lisada, libera novos taquizoítos. Dependendo da dose infectante, tanto de células sarcomatosas como de taquizoítos, tem-se uma sobrevida diferente dos animais, bem como de concentração de taquizoítos. Apesar da concentração de taquizoítos obtida ter sido muito grande, observou-se que muitas células grandes e pequenas ainda se mantinham. O ideal é a obtenção do lavado com os animais ainda vivos, o que propicia um antígeno de melhor qualidade. Quando inoculados juntamente com as células, os animais podem demorar mais para desenvolver a doença, pois os taquizoítos parasitam inicialmente as células sarcomatosas e a seguir invadem os tecidos do hospedeiro por penetração ativa, ou alcançam a circulação sanguínea ou linfática. Portanto, os lavados peritoneais devem ser obtidos antes da morte do animal, o que preserva a sua qualidade.

Com o protocolo de centrifugação, verificou-se que a quantidade de células sedimentadas era muito grande, e mesmo assim havia taquizoítos no

sedimento, e no sobrenadante, algumas células pequenas e taquizoítos. Estas células pequenas podem comprometer o resultado da prova sorológica, pois elas não interagem com os anticorpos, e se depositam, formando o “botão-de-fundo”, o que caracteriza resultado negativo.

O protocolo de sedimentação espontânea apresentou melhores resultados. Com o passar do tempo, observou-se a formação de sedimento no fundo dos tubos após um período maior de repouso, verificando-se que com mais de 60 minutos, somente taquizoítos estavam presentes no sobrenadante, e as células concentradas no sedimento da solução. Isto se deve ao peso das células e a lei da gravidade, que permite que os taquizoítos, menos pesados, demorem mais para sedimentar, comparado as células.

Os resultados sorológicos com este antígeno foram melhores comparando-se com o antígeno obtido pela técnica de centrifugação. Foi possível a detecção da “malha-de-aglutinação” e da formação do “botão-de-fundo” nos casos positivos e negativos, respectivamente.

A importância da proposta de obtenção desse antígeno se deve ao fato de não haver a necessidade de equipamento especial, como centrífuga, ou reagentes especiais, como a tripsina. Com isso, tanto a MAT como a produção do antígeno a ser utilizado em provas sorológicas são de baixo custo e não oneram a realização da prova, fator limitante em função do poder aquisitivo dos criadores ou proprietários dos animais, além dos aspectos éticos que permitem que com um menor número de animais de experimentação, se obtenha antígeno de qualidade para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose nas diferentes espécies animais, inclusive no homem.

6.2. Inativação do antígeno

O antígeno inativado com a acetona é de difícil padronização, de acordo com Thulliez (2005). A capacidade oxidativa da acetona talvez seja um fator importante a ser considerado para os resultados obtidos, uma vez que a sua ação na superfície do taquizoíto, lise e liberação do DNA, associada à interação com a proteína da solução tampão borato pH 8,9, ou outros não pesquisados, possam interferir na expressão dos marcadores de superfície, atuando na estrutura morfológica dos taquizoítos, e influenciando na formação de gel.

Em todas as situações cujo sedimento foi ressuspensionado em tampão borato pH 8,9, houve a formação de gel, o que pode ter ocorrido pela ação da acetona nos parasitas, interagindo com o DNA liberado pela lise do parasita ou pela permanência de resíduos de acetona, mesmo após os vários lavados com solução salina 0,95%, interagindo também com a albumina bovina que é adicionada à solução tampão. Thulliez et al. (1986) não relataram se houve, e quais os problemas encontrados na obtenção do antígeno, porém Thulliez (2005) confirmou a dificuldade de produção e estabilidade deste antígeno, fato que também foi verificado na presente pesquisa.

Com a utilização da solução salina 0,95%, o sedimento se desfazia sob agitação forçada, mantendo os taquizoítos íntegros. Esta solução é formada somente por sais, não havendo substâncias de natureza protéica, sendo nula as chances de interação de algum reagente com a acetona ou o DNA. Apesar destes aspectos, ao se testar a solução antigênica no mesmo dia, para a prova sorológica, nos controles positivos não houve a formação de “malha-de-aglutinação”, mas somente de “botões-de-fundo”, para todos os soros, tanto positivos como negativos, fato que deveria ocorrer somente com as amostras de soro sabidamente negativas.

A acetona permite a inativação do antígeno, porém o seu armazenamento, mesmo sob refrigeração, parece interferir na sua qualidade pela exposição contínua do antígeno e lise do mesmo. A acetona mesmo mantida sob refrigeração, quando em contato com as proteínas de membrana do taquizoíto, por um tempo prolongado, parece interagir com elas e lisar o antígeno, liberando o DNA, havendo conseqüente formação de gel.

Apesar da difícil padronização, o antígeno inativado pela acetona já fora muito utilizado na rotina laboratorial para diagnóstico em pacientes humanos, na França, sendo substituído atualmente pelo antígeno inativado pelo metanol (THULLIEZ, 2005).

Em virtude do insucesso com a acetona, e maior praticidade, utilizou-se o protocolo com metanol-25% na solução final para inativação, em substituição à acetona, sob recomendação do Pesquisador e Diretor do Instituto de Puericultura e Perinatologia de Paris, e idealizador do protocolo original da MAT-AA e MAT-AM, Dr. Philippe Thulliez. O antígeno com acetona apresenta estabilidade curta em geladeira, e possíveis problemas como a

gelificação, como detectada no presente estudo. Toda essa dificuldade pode ser devida também à capacidade oxidativa da acetona, na presença da luz.

Todos os resultados foram os esperados, referente à inativação, centrifugação e ressuspensão do sedimento, bem como na realização das provas sorológicas. Isto pode ser explicado pelo curto período de incubação, associado ao baixo peso dos taquizoítos e a constante movimentação até a inativação, onde permanecem por um longo período em suspensão, sofrendo a ação das propriedades químicas do metanol.

Tanto sob incubação em repouso como em agitação constante, o antígeno inativado com o metanol forneceu dados semelhantes e esperados quando utilizado nas provas sorológicas com controles positivos e negativos, formando uma perfeita “malha-de-aglutinação” e “botão-de-fundo”, respectivamente. Face aos resultados obtidos, optou-se pela substituição da acetona pelo metanol, para a inativação do antígeno para a sua utilização na diferenciação entre as fases aguda e crônica da toxoplasmose.

6.3. Provas sorológicas

A identificação dos níveis de anticorpos anti-*T.gondii* circulantes é de grande importância principalmente nos casos de gestantes e pacientes imunocomprometidos. Nas gestantes, a infecção fetal pode levar a morte fetal, ou a lesões graves e irreversíveis na criança. Nos imunocomprometidos principalmente pelo fato da imunidade celular estar ausente, o que prejudica a resposta humoral contra o agente invasor.

Os títulos de IgG de fase aguda em comparação aos de fase crônica se comportaram como o esperado nas primeiras semanas, onde inicialmente somente os anticorpos de fase aguda foram detectados nas duas provas de aglutinação, havendo posteriormente a diferenciação com os de fase crônica, pela diferenças de títulos entre as provas. Devido aos primeiros anticorpos IgG produzidos serem específicos de fase aguda, somente estes anticorpos estariam presentes até a segunda semana, onde os títulos da MAT-AM e MAT-AF apresentam praticamente os mesmos valores, sempre em ascensão. A partir da terceira semana verifica-se que os títulos da MAT-AF se tornam superiores, em comparação aos de MAT-AM. Isto pode ser explicado pelo processo de maturação de anticorpos, onde se inicia a produção de

imunoglobulinas de fase crônica, em adição as da fase aguda, em maior concentração. As diferenças de títulos nas semanas subseqüentes mantêm-se de forma regular, porém enfatiza-se que um período maior de infecção, como mais de um ou dois anos, seria mais eficiente para se analisar a diferenciação dos estágios agudo e crônico da infecção, pois de acordo com Thulliez et al. (1986), os títulos da MAT-AF tendem a se manter elevados com a cronificação da infecção, e adaptação do sistema imune na produção de imunoglobulinas mais maduras, enquanto que os títulos da MAT-AM tendem a diminuir, com a cronificação da infecção.

Quando se analisou a imunofluorescência para o G1 e G2, verificou-se que os títulos de IgG apesar de mais baixos que os da MAT-AF, mantiveram o mesmo perfil gráfico, com elevação dos títulos até a terceira ou quarta semana, e conseqüente estabilização. Para o G2, a partir da imunodepressão, verificou-se que ambas as provas detectaram uma elevação de anticorpos a partir da 24^a semana.

As provas de aglutinação são mais sensíveis por envolverem somente a interação antígeno-anticorpo. Por outro lado, as provas de imunofluorescência indireta, necessitam de anticorpos conjugados, que são caros, há a necessidade de microscópio especial de fluorescência, e pessoal técnico treinado para a realização das leituras. As provas de aglutinação são menos laboriosas, práticas, de baixo custo, e podem ser utilizadas para a pesquisa de anticorpos em qualquer espécie animal, pois não utiliza conjugados espécie-específica, nem imunoglobulina-específica, porém há a necessidade de padronização acurada para se evitar o risco dos resultados falso-positivos e falso-negativos.

A utilização de antígenos, cujos marcadores de superfície expressos determinam os tipos de imunoglobulinas que se ligarão, sabendo-se que esta determinação estará relacionada ao período da infecção, permite a diferenciação entre os estágios agudo e crônico da infecção toxoplásmica. Dannemann et al. (1990) verificaram que a MAT AF e MAT-AA permitem a diferenciação entre os estágios agudo e crônico a partir de uma amostra de soro, porém para maior acurácia dos resultados recomenda-se a utilização de amostras pareadas.

A IgM apresentou-se como sendo a primeira a ser produzida, como em qualquer infecção, apresentando rapidamente altos títulos, com estabilização rápida, sendo superados pela IgG. É bom salientar que mesmo durante a produção inicial e os picos de IgM, níveis basais de IgG já começam a ser produzidos, são as IgGs de fase aguda. Problemas relacionados a IgM têm sido atribuídos a resultados falso-positivos em soros contendo o fator reumatóide e anticorpos antinuclear. Em estudo com crianças infectadas congenitamente, o ELISA-IgM se mostrou muito mais sensível que a RIFI-IgM para a detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii* (NAOT & REMINGTON, 1980).

A MAT e o ELISA são duas técnicas sorológicas que permitem, pela análise de IgG, a diferenciação entre os estágios agudo e crônico da infecção toxoplásmica (GAMBLE et al., 2005).

Observou-se que os títulos do ELISA e do ELISA de avidéz apresentam uma curva de anticorpos semelhante a MAT-AF e a RIFI-IgG, porém com uma análise muito mais acurada apresentada no intervalo da sexta até a 11ª semana. O ELISA fornece variáveis contínuas, o que permite um perfeito acompanhamento da curva sorológica, sem haver a interferência de títulos, o que é uma avaliação limitada, sendo positivo ou negativo para aquele título. No ELISA o título é fornecido pela densidade óptica obtida.

No G2, na análise referente aos segundo (7ª a 11ª semanas) e terceiro (12ª a 16ª semanas) períodos, em comparação ao primeiro (1ª a 6ª semanas), é observada variação significativa para as MATs e ELISAs, o que não ocorreu para a RIFI-IgG, que apresentou variação face à imunodepressão, nos quarto e quinto períodos analisados. Isto demonstra que mesmo se tratando de provas que detectam a evolução mais ou menos acurada pelo título de anticorpos, as MATs se comportaram semelhantemente ao ELISA na maioria dos momentos analisados, sendo que o ELISA foi muito mais sensível que as provas de aglutinação, principalmente pela utilização da ligação avidina-biotina-peroxidase, tornando-se detectável a presença de qualquer anticorpo, mesmo que em baixa concentração.

Somente a RIFI-IgG não apresentou variação significativa na comparação entre os momentos. Isto se deve a rápida produção e estabilização da imunoglobulina, permanecendo por longo período em níveis elevados.

Os valores de Avr foram maiores que os de Avt, gerando uma curva que a partir da décima semana ultrapassa o limite de 50% de avides, pela interferência dos componentes da reação, mas principalmente das variações de diluições do soro, o que pode permitir a conclusão errônea de resultados da avides na caracterização do momento ou estágio da infecção, com uma detecção de alta avides em períodos prévios a sua real maturação.

Nas várias espécies animais, estudadas por Meireles (2005) houve a interferência das variações das diluições do soro, fazendo que o índice de avides para Avr fosse maior que o registrado para Avt. Sendo então a análise da Avt mais confiável, permitindo a comparação significativa do tempo de estabilização da avides dos anticorpos IgG, entre várias espécies, o que no referido trabalho foi bem variável. A Avt permitiu aos autores estabelecer em um limiar único, com igual poder discriminatório para as diferentes espécies estudadas. Esta medida tem uma relação linear com a concentração de anticorpos (LAPPALAINEN & HEDMAN, 2004). Assim como Meireles (2005), por ser mais precisa, no presente estudo utilizou-se a Avt como medida ideal da avides.

Com o presente trabalho, verificou-se que a medida da avides por título de anticorpos tem um menor efeito associado às variações de diluições do soro, conjugados ou concentrações de antígeno na placa, com curvas de menor inclinação, mostrando ter menor interferência e refletindo melhor a avides da IgG, sendo eliminada a influência das características exponenciais da atividade enzimática e da absorvância do ELISA.

A baixa avides de IgG é bem característica de uma infecção aguda. Jenum et al. (1997), estudando amostras de soros de mulheres participantes de um projeto de triagem de anticorpos anti-*T.gondii*, estudaram a avides de IgG pelo ELISA, a partir de amostras positivas para IgM colhidas na primeira metade da gestação, melhorando o diagnóstico da enfermidade. Encontraram, em alguns casos, uma baixa avides de IgG persistindo por mais de 20 semanas após o período de infecção. Porém, 72,8% apresentaram avides de IgG maior que 20%, considerada alta para este estudo. Este fato é positivo, pois a alta avides, minimiza a ansiedade das gestantes, a necessidade de exames adicionais e de se evitar o tratamento da infecção.

Flori et al. (2004) estudando a avidéz de IgG em crianças e gestantes, verificaram que o índice de avidéz nos neonatos e nas mães foi similar. Contudo, durante os dois, quatro, seis, nove e 12 meses seguintes, dois perfis diferentes emergiram. O primeiro foi que nos pacientes sem transmissão materno-fetal, o índice de avidéz não estava aumentado, com rápido decréscimo na concentração de anticorpos maternos transmitidos. O segundo foi que nos pacientes com comprovada transmissão materno-fetal, um significativo aumento do índice de avidéz em quatro pacientes tratados com espiramicina confirmou a transmissão. O aumento deste índice foi mais rápido do que nas mães.

Djurkovic-Djakovic & Milenkovic (2001) utilizaram dexametasona sozinha e associada ao acetato de cortisona, induzindo uma significativa imunodepressão e subsequente reativação do parasita em animais infectados, tendo-se um efeito maior quando associadas. Porém a utilização prolongada causa considerável toxicidade, com perda progressiva de peso e morte, com sinais gerais de fraqueza.

O modelo experimental mais utilizado para se avaliar a imunodepressão e conseqüente reagudização da infecção toxoplásmica é o camundongo. Como no presente estudo trabalhou-se com ratas, utilizou-se o protocolo de extrapolação alométrica interespecífica, descrito por Pachaly & Brito (2001), para adaptar a dose e concentração a ser utilizada de uma espécie para outra, levando em consideração o seu peso e metabolismo. Portanto, ao se extrapolar as doses e concentrações utilizadas para camundongos, para ratas, elas foram menores, e os intervalos maiores, para estes últimos, quando se comparam as doses descritas por Djurkovic-Djakovic & Milenkovic (2001).

Pela dificuldade na obtenção da droga no mercado, principalmente devido a sua disponibilidade somente em farmácias de manipulação, lipossolúvel, exigindo a ação de álcoois para sua completa dissolução, optou-se pela alteração por uma droga hidrossolúvel, como o succinato sódico de hidrocortisona, que é hidrossolúvel, e obtido facilmente no mercado.

Utilizando o protocolo descrito por Djurkovic-Djakovic & Milenkovic (2001), adaptado para ratas pelo protocolo de extrapolação alométrica interespecífica descrito por Pachaly & Brito (2001), o intervalo de administração

de dexametasona, para as ratas, foi de 48 horas, e para a cortisona foi de 108 horas, ao invés de 24 e 56 horas, respectivamente, utilizados para camundongos. Desta forma, os animais não correram o risco de intoxicação morrendo devido a reagudização da toxoplasmose.

No grupo experimental infectado e imunodeprimido observou-se que durante toda a análise experimental, apesar de em todos os casos haver diferenças entre os momentos (intervalos em semanas) para um mesmo teste sorológico, normalmente isto se concentra apenas entre o primeiro (1^a a 6^a semanas) e o segundo intervalo (7^a a 11^a semanas).

Não houve variação nos testes sorológicos entre o quarto (17^a a 21^a semanas) e o quinto (22^a a 26^a semanas) períodos analisados, à exceção da diferença entre os títulos dos testes de aglutinação e para a RIFI-IgG, onde houve variação significativa após a instituição da imunodepressão, sugerindo que tal fato pode ser um marcador eficiente na detecção da imunodepressão. Este resultado, contudo, deve ser visto com cautela, devido ao curto período de avaliação após a imunodepressão, em função da morte dos animais. Outro fator que permitiria uma melhor avaliação seria manter um grupo experimental infectado, não submetido à imunodepressão, até o final da avaliação do G2, o que permitiria comparar e avaliar o comportamento dos anticorpos, e sua avidéz após a imunodepressão, nos dois grupos.

Não se manteve um grupo experimental somente infectado, pois o objetivo inicial era a avaliação experimental de apenas 13 semanas, e a avaliação a partir da 13^a semana do efeito da imunodepressão. Não se pensou em comparar a curva pós-imunodepressão com o grupo experimental somente infectado, entretanto, a dificuldade em padronizar o protocolo de imunodepressão fez com que se prolongasse o período de experimentação do G2, sem fugir, entretanto, do objetivo inicial, que era a comparação em 13 semanas, e análise por todas as técnicas utilizadas. Porém, dados da literatura mostram que uma avaliação mais acurada para comparação entre fase aguda e crônica da infecção toxoplásmica necessitaria de uma análise com 12 meses ou mais (THULLIEZ et al., 1986).

Isto se deve principalmente ao fato da imunidade humoral desenvolvida pelo *T.gondii* apresentar títulos que permanecem elevados por longo período de tempo, como se pode observar no presente trabalho, onde a

IgM manteve títulos elevados, comparáveis aos de IgG, pela RIFI, em ambos os grupos. Tal fato também pôde ser observado para IgG nas demais provas sorológicas, onde após o pico de anticorpos ser atingido, as imunoglobulinas se estabilizaram e mantiveram-se elevadas até o final da infecção.

A avidéz dos anticorpos se manteve em ascensão. Observou-se que quando da imunodepressão no G2, os títulos de anticorpos detectados pelo ELISA apresentaram uma ligeira queda nas primeiras semanas, seguida de uma ascensão próxima a morte dos animais, enquanto isso a avidéz (Avr e Avt) se mantiveram em constante ascensão, não havendo a interferência da imunodepressão. Este fato pode estar diretamente relacionado ao tipo de resposta imunológica que sofre interferência da imunodepressão. A depressão causada pelos corticóides possivelmente estaria interferindo na resposta imune celular, com conseqüentemente redução na produção de anticorpos, fato não observado com a afinidade do anticorpo pelo seu antígeno.

A toxoplasmose já é uma doença oportunista. Os corticóides têm uma ação na imunodepressão pela ação sobre a resposta imune celular, sobre os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e, indiretamente sobre a resposta imune humoral. A barreira hematoencefálica impede o acesso de células linfocitárias e de anticorpos, dependendo somente das células de defesa localizadas no próprio cérebro, havendo ruptura dos cistos, e manifestação de lesões focais.

Para a análise, em modelos experimentais da redução da avidéz de anticorpos, é necessário trabalhar com um imunodepressor que atue sobre a produção dos anticorpos. Dados mais interessantes seriam obtidos pela associação da análise de proliferação de linfócitos. Os corticóides promovem a destruição de tecidos linfóides, resultando em linfocitopenia, monocitopenia e diminuição do tamanho do baço. A imunodepressão de camundongos com dexametasona tem induzido a liberação de parasitas de cistos preexistentes e formação de novos cistos antes e após seis a 12 dias da administração (ODAERT et al., 1996).

A MAT-AM permitiu detectar títulos de IgG de fase aguda, quando comparados a MAT-AF, dependendo do período da infecção. Porém para melhor análise seria necessário estudar indivíduos infectados durante um período maior de tempo, ao longo de dois a três anos, com a infecção crônica devidamente estabelecida, bem como a maturação das imunoglobulinas.

A MAT, com a utilização do 2ME, melhorou a sua especificidade, em virtude da exclusão de reação inespecífica com a IgM. A IgM é uma imunoglobulina com estrutura pentamérica, que é mantida por uma cadeia formada por pontes dissulfídicas, a cadeia J. O 2ME atua sobre estas pontes reduzindo-as, degradando-as em cinco subunidades não aglutinantes, desestruturando a IgM. Uma vez perdida a sua estrutura de pentâmero, a IgM se torna afuncional, não permitindo a aglutinação com o antígeno. Estas subunidades conservam suas características de antigenicidade, mas deixam de ser anticorpos plurivalentes e passam a se comportar como anticorpos univalentes. Ainda que as subunidades estejam integradas por suas cadeias pesadas e leves, ao combinarem-se com o antígeno não originam complexos suficientemente grandes para provocarem o fenômeno de aglutinação, provavelmente em consequência da sua nova conformação espacial (FERRI et al., 1977).

Como na infecção toxoplásmica, a IgM pode permanecer por anos detectável nos soros de pacientes infectados, o 2ME auxilia no diagnóstico sorológico da toxoplasmose, contribuindo para o aumento da especificidade da prova, mantendo-se a alta sensibilidade da mesma (DESMONTS & REMINGTON, 1980). As IgGs são monômeros, e, portanto produzidas com mais cuidado e mais direcionadas contra o determinante antigênico apresentado pela célula apresentadora de antígeno ao linfócito.

Thulliez et al. (1986) verificaram que a MAT-AA e a MAT-AF permitem diferenciar títulos de anticorpos entre as IgGs. Analisando uma bateria de 30 soros, onde dez pertenciam a casos de toxoplasmose recente (até seis meses), dez casos de toxoplasmose com mais de seis meses e dez casos de encefalite toxoplásmica necrosante, complicada pela AIDS, e comparando com provas sorológicas padrões, como SF, ELISA-IgM e ISAGA, verificaram que a aglutinação pode fornecer informações bem interessantes referentes ao momento da infecção.

6.4. Bioprova

A sobrevivência dos grupos experimentais avaliados demonstra que somente os animais que foram inoculados com material "*in natura*" morreram no período analisado. Nenhum dos animais inoculados com cérebro ou

musculatura digerida seja para o grupo G1 ou G2, morreram, porém apresentaram soroconversão, o que demonstra a presença do parasita no inóculo, possivelmente inativado pela ação da pepsina. Os bradizoítos são mais resistentes à ação da pepsina e tripsina, comparado ao taquizoíto. Analisando por este ponto, os animais inoculados com material não digerido podem ter morrido devido a uma grande quantidade de taquizoítos.

Apesar dos taquizoítos serem freqüentemente mortos pela exposição à solução ácida de pepsina por 30 minutos, há relatos de taquizoítos terem sobrevivido em solução ácida de pepsina por duas horas *in vitro* (DUBEY, 1998d). Em estudos *in vivo*, a dose de 10^3 taquizoítos extracelular da cepa RH de *T.gondii* foi considerada infectante em camundongos quando inoculados oralmente. Além disso, gatos alimentados com taquizoítos da cepa VEG, produtora de oocistos, infectaram-se e eliminaram oocistos.

Em todas as ratas, sacrificadas (G1) ou mortas pela doença (G2), encontrou-se pelo menos um cisto para pelo menos uma das duas provas citológicas, por “*imprint*” ou pela contagem entre lâmina e lamínula. Uma vez que as ratas apresentaram cistos cerebrais, e diante dos resultados estatísticos, verificou-se que, pela sobrevida maior dos camundongos inoculados com material muscular comparada ao cerebral, para as ratas imunodeprimidas, provavelmente elas estariam em um estágio de reagudização da infecção no momento da morte, com a liberação dos bradizoítos, primeiramente na musculatura. Tal fato possa ter ocorrido primeiramente na musculatura devido a um maior afluxo de sangue na musculatura em relação ao cérebro.

Este fato pode ser melhor evidenciado quando se comparam os grupos experimentais para cada tecido inoculado. Quando se analisa o tecido muscular como inóculo, apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) no G2 com menor período de sobrevida que no G1. Esses dados apoiam a possibilidade de ocorrência de reativação da infecção no G2, sendo o músculo o primeiro tecido onde deve ter ocorrido a destruição da membrana cística, e disseminação do parasita. Cabe ressaltar que não se avaliou pulmão e outros órgãos, que também poderiam propiciar a formação de cistos.

Jacobs & Melton (1957) verificaram a distribuição do *T.gondii* em músculos de ratos cronicamente infectados, examinando amostras de

diafragma, músculo peitoral, abdominal e de membros posteriores. Nos animais inoculados com as cepas CH e LB eles foram positivos aos três e quatro meses após a infecção, respectivamente. Nos ratos inoculados com a cepa 113-CE, de baixa virulência para camundongos, o parasita foi recuperado do cérebro até seis semanas após a inoculação, enquanto que não foi recuperado da musculatura, resultado em parte semelhante ao obtido com a cepa ME49 por Da Silva (2002), apesar de ter pesquisado somente no diafragma, enquanto que nos animais inoculados com a cepa BTU2, classificada como genótipo tipo III, recuperou-se o parasita em todas as amostras de musculatura examinada.

Zenner et al. (1998) estudaram a cinética de disseminação de duas cepas de *T.gondii* em ratos Wistar de dois meses de idade. Utilizando a cepa RH, via intraperitoneal com 10^5 taquizoítos, o baço, diafragma, e pulmões foram inicialmente infectados, seguidos de linfonodos mesentéricos e cérebro. Nenhum parasita foi observado no coração, fígado e sangue. Para a cepa Prugniaud, via oral com 1200 cistos teciduais, aos dois DPI o parasita foi encontrado nos linfonodos mesentéricos, e aos quatro DPI estavam massivamente infectados ao mesmo tempo em que o parasita era encontrado também em baço, pulmões, cérebro e fígado. Nos períodos seguintes, a concentração parasitária aumentou em todos os órgãos, com exceção do cérebro onde se manteve constante.

Freyre et al. (2001b) inocularam cistos teciduais, pela via oral, de 15 diferentes cepas de *T.gondii*, em doses de dois, 20, 200 ou 1000 cistos, em ratos Wistar, e após dois meses de infecção verificaram a presença de cistos teciduais no cérebro, pelo exame a fresco de esfregaços de tecidos. Pelo menos 200 cistos foram necessários para infectar mais de 90% dos ratos, e com baixas doses, 60% dos ratos apresentavam infecção cerebral residual. A microscopia direta foi eficiente em apenas 146 (35,50%) dos 411 animais, demonstrando a importância da bioprova em camundongos como prova definitiva para a demonstração da infecção nos animais. A eliminação do *T.gondii* do cérebro de alguns ratos pode ser a explicação para a taxa de 13% de bioprovas negativas obtida no trabalho. Uma outra explicação é a resistência individual natural de animais, ou mesmo a variação entre as linhagens de ratos.

Dubey (1997a) estudou o tropismo tecidual de cistos de *T.gondii* em pulmões, cérebro, língua, baço, coração, olhos, linfonodos mesentéricos, rins, fígado, musculatura e intestino delgado de gatos e roedores alimentados com oocistos da cepa VEG. Cistos teciduais foram encontrados com maior frequência no cérebro, musculatura esquelética, coração e rins.

Da Silva (2002) verificou que não somente o genótipo da cepa está relacionado com a manutenção do parasita nos tecidos, mas também o fenótipo efetivo de virulência, tornando-se evidente que a linhagem de ratos utilizada nos estudos experimentais influencia também a manutenção da infecção.

CONCLUSÕES

VII - CONCLUSÕES

1. Foi possível a padronização da técnica de aglutinação modificada, com antígeno inativado pelo metanol, que permite a detecção de anticorpos de fase aguda na infecção toxoplásmica, e se comparada a MAT-AF permite a diferenciação dos estágios agudo e crônico da infecção.
2. Os primeiros anticorpos da classe IgG anti-*Toxoplasma gondii* detectáveis, reconheceram somente receptores específicos de fase aguda, revelando títulos iguais para MAT-AM e MAT-AF. Com a evolução da infecção, houve a produção de IgG mais específica, permitindo o aumento gradual dos títulos de anticorpos nas duas provas sorológicas, bem como da avidéz, permitindo melhor avaliação da resposta imune. Como resultado da imunodepressão, os títulos de anticorpos diminuíram, fato não verificado com a avidéz.
3. Padronizou-se a técnica de sedimentação espontânea para a produção de maior quantidade de antígeno de qualidade, e rico em taquizoítos de *T.gondii*.
4. A técnica de sedimentação espontânea forneceu melhores resultados para a produção antigênica, sem a necessidade de equipamentos ou reagentes especiais para ruptura das células, além da utilização de um menor número de animais.
5. A solução salina 0,95% revelou melhor resultado na ressuspensão do sedimento quando da inativação pela acetona, porém na sorologia não foi possível a formação de “malha-de-aglutinação”, pela provável reação com resíduos de acetona, com as proteínas de superfície do parasita.
6. A inativação do antígeno com metanol foi mais prática, e o mesmo pôde ser armazenado por maior período de tempo, permitindo o diagnóstico sorológico, independentemente de incubação sob agitação constante ou não.

7. Foi possível a padronização do esquema de imunodepressão, com a utilização de dexametasona e succinato de hidrocortisona, com reagudização da infecção, ocorrendo a morte dos animais em 24,75 dias, em média, havendo ainda a recuperação de taquizoítos a partir do lavado peritoneal.
8. A imunodepressão não interferiu na avidéz dos anticorpos, mas sim na sua concentração, provavelmente pela sua ação na resposta imune celular.
9. A MAT-AM, quando comparada com a MAT-AF, permitiu a diferenciação entre os anticorpos IgG de fase aguda e crônica, entretanto, se sugere a realização de estudos na infecção prolongada, e também com um maior período de imunodepressão.
10. As provas de aglutinação se mostraram mais sensíveis que as provas de imunofluorescência, permitindo sua utilização a campo em inquéritos soroepidemiológicos.
11. As provas de imunofluorescência devem ser evitadas para a diferenciação entre os estágios agudo e crônico da infecção em ratas imunodeprimidas, principalmente no caso de IgM, que pode ser detectada por período de tempo prolongado.

REFERÊNCIAS

VIII – REFERÊNCIAS¹³

AJIOKA, J.W.; FITZPATRICK, J.M.; REITTER, C.P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert. Rev. Mol. Med.**, 2001. Disponível em <<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002204a.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2006.

AZEVEDO, D.S.; JAMRA, L.M.; RIBEIRO, .M.F. Isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts in 2 districts of Recife (PE). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.25, n.1, p.31-36, 1983.

BARBIERI, A.; GISTRÌ, A.; CAPPELLETTI, F.; GIORDANO, I. Diagnostic value of IgG avidity in toxoplasma infection: comparison of three commercial kits. **J. Infect. Dis.**, v.184, p.944, 2001.

BERTOZZI, L.C.; SUZUKI, L.A.; ROSSI, C.L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.41, n.3, p.175-177, 1999.

BIÑAS, M.; JOHNSON, A.M. A polymorphism in a DNA polymerase α gene intron differentiates between murine virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v.28, n.7, p.1033-1040, 1998.

BOTERREL, F.; ICHAI, P.; FERAY, C.; BOUREE, P.; SALIBA, F.; TUR RASPA, R.; SAMUEL, D.; ROMAND, S. Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.5, p.1648-1650, 2002.

¹³ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

CAMARGO, M.E.; SILVA, S.M.; LESER, P.G.; GRANATO, C.H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.33, p.213-218, 1991.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, v.10, p.143-169, 1974.

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

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Toxoplasmose: In: _____ **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 1.ed. Medsi, 1992. p.757-766.

DANNEMANN, B.R.; VAUGHAN, W.C.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.9, p.1928-1933, 1990.

DA SILVA, A.V. **Toxoplasmose experimental em ratos (*Rattus norvegicus*). Avaliação da resposta sorológica, da bioprova e comparação de oligonucleotídeos na reação em cadeia pela polimerase**. 2002. 85p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DE CHAMPS, C.; PELLOUX, H.; DECHELOTTE, P.; GIRAUD, J.C.; BALLY, N.; AMBROISE-THOMAS, P. *Toxoplasma gondii* infection in rats by the RH strain: inoculum and age effects. **Parasite**, v.5, p.215-218, 1998.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **J. Clin. Microbiol.**, v.11, p.562-568, 1980.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; MILENKOVIC, V. Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. **Acta Protozool.**, v.40, p.99-106, 2001.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Vet. Parasitol.**, v.74, n.1, p.75-77, 1998a.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v.28, n.7, p.1019-1024, 1998b.

DUBEY, J.P. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. **J. Parasitol.**, v.84, n.6, p.1279-1282, 1998c.

DUBEY, J.P. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. **Parasitol.**, v. , p.43-50, 1998d.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cyst. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, n.2, p.267-299, 1998.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis of rats: A review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Vet. Parasitol.**, v.77, n.1, p.1-32, 1998.

DUBEY, J.P. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. **Parasitol.**, v.115, p.15-20, 1997a.

DUBEY, J.P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **J. Euk. Microbiol.**, v.44, p.592-602, 1997b.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988.

DUBEY, J.P.; BRAKE, R.J.; MURRELL, K.D.; FAYER, R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, n.3, p.518-522, 1986.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J. Protozool.**, v.19, n.1, p.155-177, 1972.

ECKERT, J. Workshop summary: food safety: meat- and fish-borne zoonoses. **Vet. Parasitol.**, v.64, n.1-2, p.143-147, 1996.

FERRI, R.G.; CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. **Imunologia**. Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 1977. 316p.

FIORENTINO, D.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, n.6, p.2081-2095, 1989.

FLORI, P.; TARDY, L.; PATURAL, H.; BELLETE, B.; VARLET, M.-N.; HAFID, J.; RABERIN, H.; SUNG, R.T.M. Reliability of immunoglobulin /g antitoxoplasma avidity test and effects of treatment on avidity indexes of infants and pregnant women. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.11, n.4, p.669-674, 2004.

FREYRE, A.; CORREA, O.; FALCON, J.; MENDEZ, J.; GONZALEZ, M.; VENZAI, J.M. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. **Parasitol. Res.**, v.87, p.941-944, 2001a.

FREYRE, A.; FALCON, J.; CORREA, O.; MENDEZ, J.; GONZALEZ, M.; VENZAI, J.M. Residual infection of 15 toxoplasma strains in the brain of rats fed cysts. **Parasitol. Res.**, v.87, p.915-918, 2001b.

FUENTES, I.; RUBIO, J.M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.1566-1570, 2001.

FULTON, J.D. Micro-agglutination test for *Toxoplasma* antibodies. **Immunology**, v.9, p.491-495, 1965a.

GAMBLE, H.R.; DUBEY, J.P.; LAMBILLOTTE, D.N. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. **Vet. Parasitol.**, v.128, p.177-181, 2005.

GAMBLE, H.R.; BRADY, R.C.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. **Vet. Parasitol.**, v.82, n.2, p.129-136, 1999.

GIRALDO, M.; PORTELA, R.W.; SNEGE, M.; LESER, P.G.; CAMARGO, M.E.; MINEO, J.R.; GAZZINELLI, R.T. Immunoglobulin M (IgM)-glicoinositolphospholipid enzyme linked immunosorbent assay: an immunoenzymatic assay for discrimination between patients with acute toxoplasmosis and those with persistent parasite-specific IgM antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.4, p.1400-1405, 2002.

HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SODERLUND, M.; HEDMAN, L. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. **Rev. Med. Microbiol.**, v.4, p.123-129, 1993.

HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPÄIÄ, I. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Infect. Dis.**, v.159, n.4, p.736-740, 1989.

HOLLIMAN, R.E. Congenital toxoplasmosis: prevention, screening and treatment. **J. Hosp. Infect.**, v.30, p.179-190, 1995.

HONORÉ, S.; COUVELARD, A.; GARIN, Y.J.F.; BEDEL, C.; HÉNIN, D.; DARDÉ, M.L.; DEROUIN, F. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients. **Pathol. Biol.**, Paris, v.48, p.541-547, 2000.

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, n.12, p.5193-5198, 1996.

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.

JACOBS, L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. **Adv. Parasitol.**, v.5, n.1, p.1-45, 1967.

JACOBS, L.; MELTON, M.L. The distribution of *Toxoplasma gondii* in the muscles of rats with chronic infections. **J. Parasitol.**, v.43, p.41-42, 1957.

JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lutea in eye of normal dimensions, and microphthalmic eye, with parasites in the retina. **Cas. Lek. Cesk.**, v.62, p.1021-1027, 1923.

JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A.-G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.8, p.1972-1977, 1997.

JOHNSON, A.M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitol. Today**, v.13, n.10, p.393-397, 1997.

JOHNSON, J.; DUFFY, K.; NEW, L.; HOLLIMAN, R.E.; CHESSUM, B.S. Direct agglutination test and other assays for measuring antibodies to *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Pathol.**, v.42, p.536-541, 1989.

JONES, J.L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v.56, n.5, p.296-305, 2001.

JUNGERSEN, G.; JENSEN, L.; RASK, M.R.; LIND, P. Non-lethal infection parameters in mice separate sheep type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.25, p.187-195, 2002.

KANG, H.; SUZUKI, Y. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. **Infect. Immun.**, v.69, n.5, p.2920-2927, 2001.

KASPER, L.H.; KHAN, I.A. Antigen-specific CD8⁺ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. **Infect. Immun.**, v.66, n.4, p.1554-1560, 1998.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**. 10.ed. Atheneu, 2000. p.147-156.

KOTULA, A.W.; DUBEY, J.P.; SHARAR, A.K.; ANDREWS, C.D.; SHEN, S.K.; LINDSAY, D.S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **J. Food Prot.**, v.54, n.9, p.687-690, 1991.

LAPPALAINEN, M.; HEDMAN, K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. **Ann. Ist. Super. Sanità**, v.40, n.1, p.81-88, 2004.

MACRE, M.S. **Avaliação da quantificação da avidéz dos anticorpos maternos na abordagem laboratorial da toxoplasmose congênita**. 2002. 112p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARCA, M.C.; RAMOS, J.J.; LOSTE, A.; SÁEZ, T.; SANZ, M.C. Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified agglutination test

methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. **Vet. Parasitol.**, v.67, n.1-2, p.99-103, 1996.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, p.607-625, 1999.

MEIRELES, L.R. **Padronização e aplicações da avidéz de anticorpos IgG no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose animal.** 2005. 117p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MINEO, J.R. **Detecção de antígeno e de anticorpos, com técnicas imunoenzimáticas, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose “aguda”.** 1982. 97p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MONDRAGON, R.; HOWE, D.K.; SUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **J. Parasitol.**, v.84, p.639-641, 1998.

MONTOYA, J.G. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, v.185, suppl.1, p.S73-S78, 2002.

MOSMANN, T.R.; BOND, M.W.; COFFMAN, R.L.; OHARA, J.; PAUL, W.E. T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, n.15, p.87-97, 1986.

NAOT, Y.; REMINGTON, J.S. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, v.142, n.5, p.757-766, 1980.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Su rone infection à cops de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. **Cr. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.**, v.147, p.763-766, 1908.

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

OWENS, T.; RENNO, T.; TAUPIN, V.; KRAKOWSKI, M. Inflammatory cytokines in the brain: does the CNS shape immune responses? **Immunol. Today**, v.15, p.566-571, 1994.

PACHALY, J.R.; BRITO, H.F.V. Interespecific allometric scaling. In: FOWLER, M.E., CUBAS, P.R. **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. Iowa State University Press, 2001. p.475-481.

PELLOUX, H.; BRUN, E.; VERNET, G.; MARCILLAT, S.; JOLIVET, M.; GUERGOUR, D.; FRICKER-HIDALGO, H.; GOULLIER-FLEURET, A.; AMBROISE-THOMAS, P. Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the Vidas system (bioMerieux). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.32, n.2, p.69-73, 1998.

PONS, J.C.; SIGRAND, C.; GRANGEOT-KEROS, L.; FRYDMAN, R.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis transmission to the fetus of a pre-pregnancy maternal infection. **Presse Med.**, v.24, n.3, p.179-182, 1995.

REMINGTON, J.S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J.G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.3, p.941-945, 2004.

SÁFADI, M.A.P. Toxoplasmose. **Pediatria Moderna**, v.36, n.1-2, p.7-23, 2000.

SABIN, A.B.; FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v.108, p.660-663, 1948.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **J. Am. Med. Assoc.**, v.116, p.801-807, 1941.

SAWADOGO, P.; HAFID, J.; BELLETE, B.; TRAN MANH SUNG, R.; CHAKDI, M.; FLORI, P.; RABERIN, H.; BENT HAMOUNI, I.; CHAIT, A.; DALAL, A. Seroprevalence of *T.gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. **Vet. Parasitol.**, v.130, p.89-92, 2005.

SEGUNDO, G.R.S.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p.13-17, 2004.

SEVÁ, A.P.; SILVA, R.C.; SILVA, A.V.; CASTRO, A.P.B.; MENOZZI, B.D.; LANGONI, H. Avaliação da virulência de cepas de *Toxoplasma gondii*, em camundongos, isoladas de cães com sinais neurológicos, em Botucatu, SP. **Vet. Zootec.**, *no prelo*, 2006.

SMITH, J.L. Long-term consequences of foodborne toxoplasmosis: Effects on the unborn, the immunocompromised, the elderly, and the immunocompetent. **J. Food Prot.**, v.60, p.1595-1611, 1997.

SOUZA, V.A.; PANNUTI, C.S.; SUMITA, L.M.; ANDRADE, JR., H.F. Enzyme-Linked immunosorbent assay-IgG antibody avidity test for single sample serologic evaluation of measles. **J. Med. Virol.**, v.52, n.3, p.275-279, 1997.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche de'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare. **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, v.3, p.109-112, 1908.

SUZUKI, Y.; ISRAELSKI, D.M.; DANNEMANN, B.R.; STEPICK-BIEK., P.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S. Diagnosis of toxoplasmic encephalitis in

patients with acquired immunodeficiency syndrome by using a new serologic method. **J. Clin. Microbiol.**, v.26, n.12, p.2541-2543, 1988a.

SUZUKI, Y.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of *Toxoplasma gondii* infection in humans. **J. Clin. Microbiol.**, v.26, n.5, p.901-905, 1988b.

SWITAJ, K.; MASTER, A.; SKRZYPCZAK, M.; ZABOROWSKI, P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.11, p.170-176, 2005.

TARLINTON, D.M.; SMITH, K.G.C. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. **Immunol. Today**, v.21, n.9, p.436-441, 2000.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.**, v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.

TENTER, A.M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, v.23, p.391, 1999.

THOMAS, P.A.; PELLOUX, H. Toxoplasmosis congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasitol. Today**, v.9, n.2, p.61-63, 1993.

THULLIEZ, P. **Direct agglutination test with acetone** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <silva_rcd@fmvz.unesp.br> em 12 jul. 2005.

THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S.; SANTORO, F.; OVLAQUE, G.; SHARMA, S.; DESMONTS, G. Une nouvelle réaction d'agglutination pour le diagnostic du stade évolutif de la toxoplasmose acquise. **Pathol. Biol.**, Paris, v.34, n.3, p.173-177, 1986.

VAN DER WAAIJ, D. Formation, growth and multiplication of *Toxoplasma gondii* cysts in mouse brains. **Trop. Geogr. Med.**, v.11, p.345-360, 1959.

VENKATESAN, P.; WAKELIN, D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. **Parasitol. Today**, v.9, n.6, p.228-232, 1993.

WARNEKULASURYIA, M.R.; JOHNSON, J.D.; HOLLIMAN, R.E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **Int. J. Food Microbiol.**, v.45, p.211-215, 1998.

WILSON, M.; WARE, D.; JURANEK, D. Serologic aspects of toxoplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.196, n.2, p.277-281, 1990.

WONG, S.Y.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clin. Infect. Dis.**, v.18, n.6, p.853-861, 1994.

YAMAMOTO, J.H.; VALLOCHI, A.L.; SILVEIRA, C.; FILHO, J.K.; NUSSENBLAT, R.B.; CUNHA-NETO, E.; GAZZINELI, R.T.; BELFORT JR.; R., RIZZO, L.V. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.2018-2022, 2000.

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

A **PÊNDICES**

APÊNDICE A – PARECER DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CAMPUS DE BOTUCATU
CÂMARA DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Distrito de Rubião Jr., s/n - 18618-000 – Botucatu/SP – 55 14 6802-6105 – Fax: 55 14 6821-2343

www.fmvz.unesp.br – sta@fmvz.unesp.br

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa, intitulado **“Utilização do método de aglutinação direta para a diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplasmática**, do Pós-Graduando **Rodrigo Costa da Silva**, nível Mestrado, desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal, nesta data.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 27 de abril de 2004.



PROF. ASS. DR. JOÃO CARLOS PINHEIRO FERREIRA
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus Botucatu

APÊNDICE B – FÓRMULAS E SOLUÇÕES

1. PARA AGLUTINAÇÃO DIRETA MODIFICADA:

Solução de Tampão Borato pH 8,7 (BABS – Bovine Albumin Borate Solution)

REAGENTES	200ml	500ml	1000ml
Cloreto de sódio	1,4g	3,51g	7,02g
Ácido bórico	0,62g	1,55g	3,09g
Albumina bovina fração V segundo Cohn	0,80g	2,00g	4,00g
Hidróxido de sódio 1N	4,8ml	12ml	24ml
Água deionizada estéril ou ultrapura	195,2ml	488ml	976ml

Ajustar o pH para 8,7.

Solução de Tampão Borato pH 8,9 (BABS – Bovine Albumin Borate Solution)

REAGENTES	200ml	500ml	1000ml
Cloreto de sódio	1,4g	3,51g	7,02g
Ácido bórico	0,62g	1,55g	3,09g
Albumina bovina fração V segundo Cohn	0,80g	2,00g	4,00g
Hidróxido de sódio 1N	4,8ml	12ml	24ml
Água deionizada estéril ou ultrapura	195,2ml	488ml	976ml

Ajustar o pH para 8,9.

Solução Tampão Borato pH 8,95 (BABS – Bovine Albumin Borate Solution)

REAGENTES	200ml	500ml	5000ml
Cloreto de sódio	1,40g	3,51g	35,06g
Ácido bórico	0,62g	1,55g	15,46g
Albumina bovina fração V segundo Cohn	0,80g	2,00g	20,00g
Azida sódica	0,20g	0,50g	5,00g
Água deionizada estéril ou ultrapura	200ml	500ml	5000ml

Ajustar o pH para 8,95.

Solução Salina Tamponada de Fosfatos (SST 0,01M pH 7,2)

REAGENTES	1 litro	2 litros	3 litros	5 litros
Cloreto de sódio	8,183g	16,366g	24,549g	40,915g
Fosfato de potássio monobásico	1,052g	2,103g	3,155g	5,258g
Fosfato de potássio dibásico	0,310g	0,621g	0,931g	1,552g
Água destilada	1000ml	2000ml	3000ml	5000ml

Ajustar o pH para 7,2.

SST 0,01M pH 7,2 + 2-mercaptoetanol

Para 10ml:

SST 0,01M pH 7,2	10000µl
2-mercaptoetanol	140µl

Solução de Tampão Borato pH 8,95 + 2-mercaptoetanol

Para 10ml:

Tampão borato pH 8,95	10000µl
2-mercaptoetanol	140µl

2. PARA BIOPROVA:Solução de Bicarbonato de Sódio 1,2%

Bicarbonato de sódio	6g
Água destilada	500ml

Solução de Cloreto de Sódio (solução salina) 0,95%

Cloreto de sódio	5g
Água destilada	526ml

Solução Ácida de Pepsina

Pepsina	5,2g
Ácido clorídrico	14ml
Cloreto de sódio	5g
Água destilada estéril q.s.p.	1000ml

Solução Salina 0,18% de Antibióticos (SSA)

Cloreto de sódio	0,18g
Água destilada estéril	100ml
Penicilina G potássica	200.000U
Estreptomicina	20mg

Solução de GIEMSA

Formaldeído (37 a 40%)	100ml
Azul de metileno	6g
Glicerina PA	324ml
Metanol PA	504ml

Solução Tampão de Sorensen pH 7,0*Solução A*

Fosfato de sódio monobásico	11,87g
Água destilada	1000ml

Solução B

Fosfato de potássio monobásico	9,07g
Água destilada	1000ml

Homogeneizar as soluções A e B em partes iguais e ajustar o pH para 7,0

3. PARA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA:Solução Salina Tamponada de Fosfatos (SST 0,01M pH 7,2)

REAGENTES	1 litro	2 litros	3 litros	5 litros
Cloreto de sódio	8,183g	16,366g	24,549g	40,915g
Fosfato de potássio monobásico	1,052g	2,103g	3,155g	5,258g
Fosfato de potássio dibásico	0,310g	0,621g	0,931g	1,552g
Água destilada	1000ml	2000ml	3000ml	5000ml

Ajustar o pH para 8,7.

Solução de Azul de Evans a 20mg%*Solução-mãe*

Azul de Evans	0,02g
SST 0,01M pH 7,2	100ml

Solução para uso (4mg%), 1:5

Solução-mãe	1ml
SST 0,01M pH 7,2	4ml

4. PARA ENSAIO IMUNOENZIMÁTICOSolução Salina Tamponada de Fosfatos (PBS) 0,01M pH7,2 (10x)

Cloreto de sódio	82,00g
Fosfato de sódio monobásico	10,50g
Fosfato de sódio dibásico	3,55g
Água bidestilada q.s.p.	1000ml

PBS-Tween-Molico (PBSTL)

SST 0,01M pH 7,2	2000ml
Tween	1ml
Leite em pó desnatado Molico	6g

Solução Tampão Fosfato Citrato (OPD-ELISA)

Ácido cítrico	10g
Orto-fenilenodiamina (OPD)	0,5g
Fosfato de sódio dibásico	14,5g

Misturar e aliquotar 0,5g por microtubo. Manter a 4 °C até o momento do uso.

USO: adicionar 20ml de água deionizada ou destilada + 10µl de água oxigenada para cada microtubo.

Solução Tampão Carbonato de Sódio 0,1M, pH 9,5*Solução A – Carbonato de sódio 0,5M*

Carbonato de sódio	5,3g
Água deionizada ou destilada	100ml

Solução B – Bicarbonato de sódio 0,5M

Bicarbonato de sódio	4,2g
Água deionizada ou destilada	100ml

Misturar 10ml da solução A + 13ml da solução B

Solução HCl 4N

Ácido clorídrico	234g
Água deionizada estéril	1000ml

Solução de Uréia 8M

Uréia	480,48g
Água destilada	1000ml

Solução de Uréia 6M

Uréia	360,36g
Água destilada	1000ml

5. PARA CONTAGEM DE BRADIZOÍTOS:

Em câmara de Neubauer:

$$N^{\circ} \text{bradizoítos/mm}^3 = \left[\frac{\text{média do } N^{\circ} \text{bradizoítos contados}}{\text{altura x diluição} \times \left[\frac{N^{\circ} \text{campos contados}}{25} \right]} \right]$$

6. PARA CONTAGEM DE CISTOS TECIDUAIS:

Em lâmina lisa comum, coberta com lamínula 22mmx22mm:

$$N^{\circ} \text{total de cistos} = N^{\circ} \text{cistos contados} \times \left[\frac{500\mu\text{l} \times (N^{\circ} \text{de cérebros})}{25\mu\text{l}} \right]$$

Para acertar a concentração, utilizar a fórmula: $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$, sendo:

C_i = Concentração inicial

V_i = Volume inicial

C_f = Concentração final

V_f = Volume final

APÊNDICE C – LISTAGEM DE REAGENTES

Tabela 13 – Listagem de reagentes utilizados. Botucatu, 2006

Reagente	Marca	Código	N° lote
2-mercaptoetanol, 99%	Reagen [®]	-	-
Acetona PA	Synth [®]	A1017	29379
Ácido bórico	Dinâmica [®]	-	13092
Ácido cítrico	Chemco [®]	-	8959
Ácido clorídrico	Synth [®]	30650	13926
Água oxigenada	Chemco [®]	-	2183
Albumina bovina fração V seg. Cohn	Inlab [®]	-	824759
Avidina conjugada a peroxidase	Sigma [®]	-	-
Azida sódica	Dinâmica [®]	-	18585
Azul de Evans	FlukaAG [®]	46160	2505120986
Azul de metileno	Vetec [®]	598	910544
Bicarbonato de sódio	Merck [®]	-	808090
Carbonato de sódio	Art Lab [®]	2976-9	001462
Cloreto de sódio	Nuclear [®]	311903	02091441
Conjugado biotilado anti-IgG rato	Dako Cytomation [®]	E0468	-
Conjugado FITC anti-IgM rato	Bethyl laboratories Inc [®]	A110-100F	-
Conjugado FITC anti-IgG rato	Bethyl laboratories Inc [®]	A110-105F	-
Dexametasona	Teuto [®]	-	0474021
Estreptomicina	Farmavet [®]	-	001/05
Formaldeído PA	Synth [®]	F1019	30896
Fosfato de potássio dibásico	Vetec [®]	315	962204

Tabela 13 – Listagem de reagentes utilizados. Botucatu, 2006

Reagente	Marca	Código	N° lote
Fosfato de potássio monobásico	Vetec [®]	225	952136
Fosfato de sódio dibásico	Vetec [®]	129	972242
Fosfato de sódio monobásico	Vetec [®]	1236	962414
Glicerina PA	Synth [®]	G1005	28490
Heparina sódica 5000U/ml	Ariston [®]	-	-
Hidróxido de sódio	Synth [®]	36420	25923
Isopore Membrane Filters (3,0µm)	Millipore [®]	TSTP04700	
Leite em pó desnatado, Molico [®]	Nestlé [®]	-	-
Metanol PA	Synth [®]	A1096	31025
orto-fenilenodiamina (OPD)	Sigma [®]	-	29H5080
Penicilina G potássica 5000000 U	Prodotti [®]	-	0507124
Pepsina 1:10000 NF	Nuclear [®]	311838	04070887
Succinato sódico de hidrocortisona	Eurofarma [®]	-	-
Tripsina 2,5% (100ml)	Gibco [®]	15090-046	1269334
Tween 20	Synth [®]	T102802BI	44635
Sulfadiazina (Sulfadrin [®])	Lab. Catarinense SA [®]	-	8392
Uréia	Synth [®]	500	20633

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)