

Natalia Nepomuceno de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DE CEPAS DE *T. GONDII***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Imunologia)

**São Paulo
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Natalia Nepomuceno de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE CEPAS
DE *T. GONDII***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Imunologia)

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

**São Paulo
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Oliveira, Natalia Nepomuceno.

Caracterização funcional de cepas de *Toxoplasma gondii* / Natalia Nepomuceno.de Oliveira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Luiz Vicente Rizzo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia ocular.

Versão do título para o inglês: Functional characterization of *Toxoplasma gondii* strains.

Descritores: 1. *Toxoplasma gondii* 2. Células dentríticas 3. Citocinas 4. Camundongos C57B1/6 5. Cepas de *T. gondii* 6. Células CD4(+) I. Rizzo, Luiz Vicente II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB14/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natalia Nepomuceno Oliveira.

Título da Dissertação: Caracterização funcional de cepas de *Toxoplasma gondii*.

Orientador(a): Luiz Vicente Rizzo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

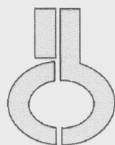
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 07 de fevereiro de 2007.

PARECER 763/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 72ª reunião realizada em 06.02.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "**Caracterização molecular e funcional de cepas de T.gondii isoladas a partir de pacientes com retinocoroidite toxoplásmatica**".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **06 de fevereiro de 2008**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
NATALIA NEPOMUCENO DE OLIVEIRA
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP

Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° **100** nas fls. **35** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Luiz Vicente Rizzo, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Caracterização molecular e funcional de cepas de T.gondii isoladas a partir de pacientes com retinocoroidite toxoplásmica**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Natalia Nepomuceno de Oliveira e a pesquisadora Lilia da Silva Rios**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **19.09.2006**.

São Paulo, 20 de setembro de 2006.

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA - ICB/USP

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Caio e Célia, a quem devo tudo que sou,
e que me fazem acreditar que posso tudo...
Aos meus irmãos, Adriana e Gabriel,
os anjos da minha vida...*

Muito Obrigada!!!!

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Luiz Vicente Rizzo, por ter me aceitado em seu laboratório e me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

À Dra Lília Rios, por ter me ensinado tudo que sei e por ter me ajudado na realização deste trabalho. Além de ser uma ótima profissional, é uma amiga muito querida que conquistei nesse anos de trabalho. Obrigada por tudo, conselhos, broncas, ensinamentos, diretrizes...

Aos meus pais, por serem pessoas tão maravilhosas, que sempre acreditaram em mim e em meus sonhos. Obrigada e desculpa pelos meus momentos de impaciência, irritabilidade... mas se hoje estou aqui é por lutar em nunca decepcioná-los!!!

Aos meus irmãos, por quem luto para sempre ser um exemplo, uma tarefa um tanto árdua.

Ao Marcelo, que me acompanhou durante toda a realização deste trabalho, me dando força e coragem nos momentos em que já não acreditava mais em mim.

Às minhas queridas Amoras, pessoas mais que especiais, que sempre acreditaram em mim, que sempre estiveram presente em minha vida, em todos os momentos, me colocando pra cima, me dando força e vontade de seguir em frente. Não tenho palavras para agradecê-las.

À minha amiga da vida inteira, Carolina, um parágrafo especial. Amiga, irmã, companheira da vida.

À minha família e amigos que sempre torceram por mim, mesmo sem entenderem o que eu estudava. E não posso deixar de agradecer aos Santos que tanto minha avó "atormentou" para que eu realizasse este trabalho (risos!)

À Dra Alessandra, uma querida amiga, que me ajudou muitíssimo, e com quem tanto aprendi nesses anos, não somente profissionalmente, mas por ser um exemplo de pessoa, força, coragem. Admiro demais esse exemplo de pessoa e vida... Obrigada por todos os momentos de descontração, conversas, conselhos, etc..

À queridíssima amiga Christina, a melhor técnica de laboratório, que me ajudou demais na realização deste trabalho, e com quem eu adorava fazer experimentos, pelas conversas, conselhos, risadas e até mesmo choros. Obrigada pela sua amizade, e por ser essa pessoa tão especial.

Ao Jean, pela amizade, e por ter me ajudado tanto na aquisição de amostras no FACs. Adorei todas as nossas conversas!!!

À todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Imunologia Clínica e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Cada um de vocês, com certeza, tiveram sua parte na realização deste trabalho.

Aos queridíssimos amigos do Departamento e do Cursão, que tornaram nossos congressos inesquecíveis. Obrigada Taty, Paty Dani, Déia, , Layra, Dé, Carol.

*À minha banca de qualificação, Prof. José Maria Mosig, Prof. Marcelo Urbano e Profa Solange Gennari, pelas críticas e sugestões feitas durante o exame de qualificação. E em especial a Dra Solange por ter cedido as cepas de *T. gondii* para finalização dos experimentos.*

Aos funcionários do Biotério de Criação e Experimentação do ICB-USP e aos funcionários do Departamento de Imunologia, sempre solícitos e competentes.

Obrigada do fundo do coração a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, e minhas sinceras desculpas àqueles que não foram citados.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo (FAPESP)

RESUMO

OLIVEIRA N. N. **Caracterização funcional de cepas de *Toxoplasma gondii***. 105 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

Mais de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo encontram-se infectadas com *Toxoplasma gondii*. Na região endêmica de Erechim, RS, cerca de 90% da população é soropositiva e cerca de 18% destes indivíduos apresentam lesões oculares com manifestações clínicas. A estrutura genética das populações do *T. gondii* tem sido bastante investigada, a despeito da infecção ter se espalhado pelo mundo, do grande número de hospedeiros intermediários e da capacidade do parasita de se reproduzir sexualmente. Linhagens de *T. gondii* com atípica ou nova combinação de alelos têm sido isoladas de animais não domésticos ou em outros continentes, como América do Sul e África, e de pacientes com apresentações clínicas incomuns. Em modelos murinos, as linhagens com o genótipo tipo I são altamente virulentas, em contraste às cepas tipo II e tipo III que são menos virulentas. Este trabalho propõe a caracterização fenotípica da resposta imune do hospedeiro frente a infecção por diferentes cepas de *T. gondii*, bem como o isolamento e a caracterização genotípica das linhagens de *T. gondii* que infectam indivíduos de Erechim no Rio Grande do Sul. Para a caracterização fenotípica utilizamos duas cepas de *T. gondii* já bem estabelecidas, a cepa RH (tipo I) e a ME49 (tipo II), e uma cepa isolada a partir de gatos domésticos do Brasil, chamada TgCatBr71. Sendo assim, através da fenotipagem das células dendríticas de camundongos C57Bl/6 infectados com as cepas citadas, foi possível observar que essas cepas induzem expressão das moléculas de superfície CD40, CD80, CD86 e MHC classe II em DCs CD11c⁺, porém sem significativa diferença entre as cepas. Com relação as células CD4⁺ e células CD8⁺, observamos o aumento das células CD8⁺ no decorrer da infecção pelas cepas RH e ME49, indicando a importância deste tipo celular na resposta protetora contra *T. gondii*. Avaliamos também a produção de citocinas IL-12, IFN- γ e IL-10 em células esplênicas de camundongos infectados pelas três cepas no decorrer da infecção e detectamos que camundongos infectados pela cepa tipo II (ME49) apresentam síntese maior dessas citocinas do que camundongos infectados pela cepa tipo I (RH) e pela cepa TgCatBr71. Assim, concluímos que esta cepa TgCatBr71 se assemelha bastante a cepa do tipo I (RH), tanto em relação a evolução da doença no camundongos como nos padrões da resposta imune do hospedeiro. E que apesar dessas duas cepas diferirem da cepa tipo II (ME49), resultando em graus diferentes de patologia em camundongos C57Bl/6, todas as três cepas parecem produzir semelhante resposta imune protetora do hospedeiro.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Células dendríticas. Citocinas. Camundongos C57Bl/6. Cepas de *T. gondii*. Células CD4⁺ e CD8⁺.

ABSTRACT

OLIVEIRA N. N. **Functional characterization of *Toxoplasma gondii* strains.** (Master Thesis) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2009.

More than 2 billion people are infected with *Toxoplasma gondii* around the world. In the endemic region of Erechim, RS, Brazil, about 90% of the population is seropositive and about 18% of these individuals have ocular lesions with clinical manifestations. The genetic structure of strains of *T. gondii* has been investigated, despite the infection has spread throughout the world, the large number of intermediate hosts and the ability to reproduce sexually. Strains of *T. gondii* with atypical or new combination of alleles have been isolated from wild animals and other continents, such as South America and Africa, and also from patients with unusual clinical presentations. In murine models, the type I genetic lineage are highly virulent, in contrast to strains type II and type III. Our work proposes the phenotypic characterization of the host immune response against the infection by different strains of *T. gondii*, and the isolation and genetic strains characterization of *T. gondii* that infect individuals of Erechim in RS, Brazil. In the phenotypic characterization were used two strains of *T. gondii* already well established, the strain RH (type I) and ME49 (type II), and a strain isolated from domestic cats from Brazil, called TgCatBr71 (type BrI). Thus, by phenotyping dendritic cells of C57BL/6 mice infected with the strains mentioned, we observed that these strains upregulated the expression of surface molecules such as CD40, CD80, CD86 and MHC class II in DC CD11c⁺ although with no significant difference between the strains. With respect to the CD4⁺ and CD8⁺ cells, no differences were observed between the *T. gondii* strains. We also evaluated the production of cytokines IL-12, IFN- γ and IL-10 from spleen cells and found that mice infected by the strain type II (ME49) have increased synthesis of these cytokines than mice infected by the strain type I (RH) and the strain type BrI (TgCatBr71). Thus, we concluded that type BrI (TgCatBr71) strain is similar to type I (RH) strain, both for the evolution of the disease and also concerning the immunological parameters evaluated. Besides, despite these two strains differ from the strain type II (ME49), resulting in different degrees of pathology in mice C57BL / 6, all three strains seem to produce similar protective immune response of the host.

Key words: *Toxoplasma gondii*. Dendritic cells. Cytocynes. C57Bl/6 mices. *T. gondii* strains. CD4⁺ and CD8⁺ cells.

SUMÁRIO

1 Introdução	14
1.1 O parasito	15
1.2 Características genéticas do parasito	18
1.3 Transmissão	20
1.4 Patologia	21
1.5 Resposta Imune ao parasito	23
1.6 Toxoplasmose em Erechim	29
2 Objetivos	32
2.1. Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 Material e Métodos	34
3.1 Pacientes	35
3.2 Obtenção de plasma e de células mononucleares do sangue periférico	35
3.3 Cultura de LLCMK2 (ATCC CCL-7)	36
3.4 Manutenção da cepa tipo I (RH) de <i>T. gondii</i>	36
3.5 Infecção de camundongos pela cepa tipo I (RH) e tipo II (ME49) de <i>T. gondii</i>	36
3.6 Obtenção e manutenção das cepas tipo I e tipo II em camundongos	38
3.7 Obtenção de células esplênicas de camundongos	38
3.8 Preparação do antígeno do <i>Toxoplasma gondii</i>	39
3.9 Cultura de células esplênicas para avaliação da produção de citocinas	39
3.10 Dosagem de citocinas em cultura de células esplênicas	40
3.11 Citometria de fluxo	41
3.12 Extração de DNA genômico	41
3.13 Reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) e de Nested-PCR	42
3.14 Análise Estatística	43

<i>4 Resultados</i>	<i>44</i>
<i>4.1 Infecção de camundongos com as cepas tipo I e tipo II de T. gondii</i>	<i>45</i>
<i>4.2 Confirmação da infecção por T. gondii através de reação de nested PCR</i>	<i>46</i>
<i>4.3 Avaliação da fenotipagem de células dendríticas de baço de camundongos</i>	<i>50</i>
<i>4.4 Correlação entre a porcentagem de célula CD4 e células CD8 e a infecção por diferentes cepas de T. gondii</i>	<i>65</i>
<i>4.5 Análise das citocinas produzida em camundongos infectados por diferentes cepas de T. gondii</i>	<i>69</i>
<i>5 Discussão</i>	<i>76</i>
<i>6 Conclusões</i>	<i>86</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>88</i>
<i>Anexos</i>	<i>101</i>
<i>Anexo 01</i>	<i>102</i>
<i>Anexo 02</i>	<i>104</i>
<i>Anexo 03</i>	<i>105</i>

1 Introdução

1 Introdução

Toxoplasma gondii é um protozoário patogênico intracelular obrigatório, descrito pela primeira vez em 1908 na Tunísia por Nicole e Manceaux de formas oriundas do roedor *Ctenodactylus gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1908) e no Brasil por Splendore de formas recolhidas de coelhos de laboratórios (SPLENDORE, 1908). Este protozoário, que pertence ao filo Apicomplexa subclasse Coccidia, é capaz de infectar e replicar dentro de qualquer célula nucleada de mamíferos ou aves (WONG e REMINGTON, 1993; DUBEY, 1998). O ciclo de vida é dividido entre infecções felinas (hospedeiro definitivo) e não-felinas (hospedeiro intermediário), que estão correlacionadas com replicação sexuada e assexuada, respectivamente (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Infecções causadas pelo *T. gondii* estão amplamente distribuídas em humanos e animais atingindo um terço da população humana por todo mundo (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000) e importante também como uma das mais comuns infecções oportunistas de pacientes com HIV (DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998).

1.1 O parasito

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteroxênico facultativo com três formas de vida: esporozoítos (presentes nos oocistos), bradizoítas (formando cistos teciduais) e taquizoítas (intra e extracelulares), todas três infectantes. Estas formas estão ligadas em um complexo ciclo de vida (DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998) envolvendo hospedeiros definitivos e intermediários. Os felídeos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii* e o gato doméstico é o mais importante. A fase sexuada ocorre apenas na mucosa intestinal do hospedeiro definitivo, com a produção de milhões de oocistos que são liberados nas fezes e que em ambiente úmido esporulam. Depois da esporulação, os esporozoítos tornam-se infectantes e quando ingeridos por mamíferos (incluindo o homem), transformam-se em taquizoítas (DUBEY, MILLER e FRENKEL, 1970; FRENKEL, 1973); (para revisão veja DENKERS, 1999).

A forma taquizoíta tem formato de meia lua e tamanho aproximado de uma hemácia (2µm x 6 µm), apresentando a região anterior afilada e a posterior recurvada. O núcleo freqüentemente está situado junto a parte posterior ou na região central da célula (HILL, CHIRUKANDOTH e DUBEY, 2005).

O taquizoíta corresponde ao estágio de multiplicação rápida do parasito em células do hospedeiro intermediário e em células epiteliais intestinais do hospedeiro definitivo (SHEFFIELD e MELTON, 1968; VIVIER e PETITPREZ, 1972; KOHLER *et al.*, 1997). Esta forma tem a capacidade de entrar em todas as células nucleadas por penetração ativa e formar um vacúolo parasitóforo (DOBROWOLSKI e SIBLEY, 1996). Após repetidas replicações do taquizoíta, por multiplicação assexuada do tipo endodiogenia, as células hospedeiras são rompidas. Ocorre então a disseminação do taquizoíta pelo corpo do hospedeiro via hematogênica e a contaminação, principalmente do sistema nervoso central e musculatura esquelética e cardíaca. Esta forma do parasito causa uma forte resposta inflamatória e destruição de tecidos e, portanto, pode levar a manifestações clínicas.

De acordo com a pressão da resposta imune a forma taquizoíta se transforma em bradizoítas, formando cistos teciduais, que variam de 5 a 70µm de tamanho. As paredes dos cistos teciduais são elásticas, finas (< 0,5 µm) e devem conter centenas ou milhares de bradizoíta (HILL, CHIRUKANDOTH e DUBEY, 2005). Estes têm formato mais arredondado que o taquizoíta diferindo na fisiologia já que possuem multiplicação mais lenta (por endodiogenia) e expressão de moléculas específicas e funcionalmente diferentes (MONTROYA e LIESENFELD, 2004). Eles possuem o núcleo situado na parte posterior, enquanto nos taquizoítas o núcleo é localizado centralmente e bradizoítas são menos susceptíveis a destruição por enzimas proteolíticas que os taquizoítas.

Cistos teciduais contendo centenas ou milhares de bradizoítos podem se desenvolver em órgãos viscerais, como pulmão, fígado e rins, porém, são mais prevalentes em tecidos neurais e musculares, como olhos, cérebro, músculo esquelético e cardíaco, podendo permanecer intactos durante a vida inteira do hospedeiro sem causar nenhum dano à saúde (DUBEY, 1988). A forma bradizoíta pode ser liberada dos cistos, transformando-se em taquizoíta e causando a ressurgência da infecção em pacientes imunocomprometidos (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Os gatos liberam oocistos depois de ingerirem alguma das três fases infectantes do *T. gondii* (taquizoíta, bradizoíta ou esporozoíta). O período pré-latente e a frequência de oocistos liberados variam de acordo com estágio do *T. gondii*, (DUBEY e FRENKEL, 1976; FREYRE *et al.*, 1989; DUBEY, 1996) sendo o período de 3 a 10 dias para cistos teciduais, maior que 18 dias para oocistos (DUBEY, 1996) e maior que 13 dias para taquizoíta (DUBEY, 1998). Depois da ingestão de cistos teciduais pelo hospedeiro definitivo, a parede cística é dissolvida

no estômago ou intestino delgado por enzimas proteolíticas, e ocorre a liberação da forma bradizoíta, que penetra nas células epiteliais do intestino e inicia-se a fase assexuada do ciclo (merogonia), havendo o desenvolvimento de numerosas gerações de *T. gondii*, (DUBEY e FRENKEL, 1972). Em seguida, ocorre o ciclo sexuado com formação de gametas masculinos móveis (microgametas) e femininos imóveis (macrogametas). O macrogameta permanece dentro da célula epitelial, enquanto os microgametas saem de sua célula e fecundam o macrogameta formando o ovo ou zigoto. Este evolui dentro do epitélio, gerando o oocisto. Esta célula epitelial rompe em alguns dias, liberando o oocisto ainda imaturo (forma não infectiva). Esta forma alcança o meio externo juntamente com as fezes. A maturação no meio ambiente ocorre por um processo denominado esporogonia, após um período de cerca de quatro dias, que depende da temperatura e umidade. Oocistos esporulados contêm dois esporocistos elipsóides, sendo que cada esporocisto contêm quatro esporozoítos com tamanho de 2 x 6-8µm (DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998).

Dentro do hospedeiro intermediário, o parasito *T. gondii* se converte entre taquizoíta e bradizoíta. Gross, Holpert e Goebel (2004) consideram o estágio replicativo do taquizoíta como sendo responsável pela infecção aguda/ativa e expressão de antígenos imunodominantes que induzem a uma forte resposta imune celular e reciprocamente provocam o processo de diferenciação ativa e imunologicamente fraca – o estágio cístico. A imunodominância do taquizoíta é também responsável por indução de forte resposta imune humoral conduzida pela formação de anticorpos especificamente dirigidos contra antígenos taquizoíticos. Em contraste, a forma bradizoíta que está associada à infecção inativa/crônica, parece não ser um forte indutor de anticorpos específicos. No entanto, desde que a resposta humoral de anticorpos é também dirigida contra antígenos que estão em ambos os estágios, o sorodiagnóstico não pode discriminar adequadamente entre infecção ativa e inativa/crônica (GROSS *et al.*, 1996).

A entrada do *T. gondii* na célula do hospedeiro é um processo ativo que aparentemente envolve filamentos de actina e miosina do parasito e certas proteínas transmembranas que se ligam a estes filamentos (KING, 1988). O processo de invasão do parasito é semelhante a fagocitose no que diz respeito à residência do parasito dentro de um vacúolo citoplasmático logo após invaginação da membrana citoplasmática. No entanto, apresenta aspectos bem distintos, sendo a invasão um processo polarizado, ocasionado pela região apical do parasito (HIRAI, HIRATO e YANAGAWA, 1966; AJIOKA *et al.*, 1998). Este é um processo rápido e

há a constrição do corpo do parasito quando este passa através da membrana da célula do hospedeiro. Já a fagocitose é um processo mais lento, e está associado a um rearranjo do citoesqueleto da célula (JONES, YEH e HIRSCH, 1972; AIKAWA *et al.*, 1977; NICHOLS e O'CONNOR, 1981).

1.2 Características genéticas do parasito

A estrutura genética das populações do *T. gondii* tem sido bastante investigada a despeito da infecção ter se espalhado pelo mundo, do grande número de hospedeiros intermediários e da capacidade do parasito se reproduzir sexuadamente. Análises filogenéticas e estatísticas revelaram resultados inesperados, sugerindo uma estrutura populacional inusitada para o *T. gondii* (HOWE e SIBLEY, 1995). Vários estudos mostram que na Europa e na América do Norte a maioria das linhagens de *T. gondii* compreende três distintas linhagens clonais (também denominados tipos ou famílias), (HOWE e SIBLEY, 1995; GRIGG *et al.*, 2001), que diferem geneticamente em 1% ou menos (SU *et al.*, 2003). As linhagens de *T. gondii* designadas tipo I, tipo II e tipo III, diferem quanto à virulência e padrão de ocorrência epidemiológica (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992).

Para a caracterização genotípica do *T. gondii*, estudos iniciais subdividiam o parasito isolado baseando-se em antígenos (WARE e KASPER, 1987; BOHNE, GROSS e HASEMANN, 1993) e análises isoenzimáticas (DARDE, BOUTEILLE e PASTRE-ALEXANDRE, 1993; ASAI *et al.*, 1995). Caracterização das linhagens de *T. gondii* tem sido baseada na análise por restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR. (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992) e o gene SAG2 que codifica o antígeno de superfície p22 do taquizoíta é o loci mais comumente investigado, mas também alguns outros trabalhos incluem a análise de SAG1, SAG3, SAG4, ROP1 e B1 (HOWE e SIBLEY, 1995; GRIGG *et al.*, 2001).

No entanto recentes estudos em isolados de humanos e animais de regiões geográficas distantes revelaram alta variabilidade genética do que o mostrado anteriormente (AJZENBERG *et al.*, 2004; LEHMANN *et al.*, 2004) Esses estudos mostraram que isolados de *T. gondii* do Brasil são geneticamente diferentes dos parasitas da América do Norte e Europa (LEHMANN *et al.*, 2004, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2006; DUBEY *et al.*, 2007 a,b), sendo mostrado que em contraste com a estrutura populacional da América do Norte e Europa, no qual predominam três linhagens clonais, na América do Sul, principalmente Brasil, existe uma estrutura populacional epidêmica com

algumas expansões das linhagens clonais (PENA et al., 2008). A rede filogenética de isolados de *T. gondii* do Brasil é altamente reticulada, sugerindo alta taxa de recombinação na população do parasita (PENA et al., 2008).

Muitas cepas de *T. gondii* têm sido isoladas em diversos locais do Brasil a partir de gatos, cachorros e frangos. Através da genotipagem multilocus por PCR-RFLP, essas cepas tem sido genotipadas, revelando alta diversidade dessa população de *T. gondii* no Brasil. Essas linhagens foram divididas em quatro grupo denominados tipo BrI, tipo BrII, tipo BrIII e tipo BrIV. Em camundongos as cepas tipo BrI foram altamente virulentas tendo 100% de mortalidade, as cepas tipo BrII apresentaram virulências intermediária, as cepas tipo BrIII foram consideradas não virulentas, e as cepas tipo BrIV por terem apresentado mortalidade variada em camundongos, sugeriram um fenótipo de virulência intermediária (PENA et al., 2008)

A virulência do *T. gondii* é normalmente definida tendo como base a dose letal $_{50}$ (LD $_{50}$) em modelos murinos, no entanto pouco se sabe da virulência de *T. gondii* em outras espécies. A linhagem tipo I é altamente virulenta em camundongo com dose letal de apenas um único parasito viável. Em contraste as cepas tipo II e tipo III têm a LD $_{50}$ em mais que 10^3 parasitos e o resultado da infecção é dependente do genótipo do hospedeiro.

A virulência da linhagem tipo I é em parte resultado do aumento da migração e altas taxas de crescimento, que permite rápida disseminação (BARRAGAN e SIBLEY, 2002), alcançando alta carga parasitária, o que finalmente libera a cascata de mediadores pró-inflamatórios que induzem a patologia (GRAVRILESCU e DENKERS, 2001). Ainda não é sabido se estas diferenças observadas em camundongos estão relacionadas com as diferentes incidências ou manifestações clínicas em outras espécies, incluindo humanos.

Essas diferenças na capacidade de migração devem contribuir para as alterações cepa - específicas do parasito na disseminação e acesso aos locais de imunoprivilégio, tais como sistema nervoso central. Barragan e Sibley (2002) demonstraram que uma subpopulação do tipo I do parasito apresenta aumentada migração *in vitro*, comparada com as cepas do tipo II e tipo III. A taxa de crescimento é também um traço da virulência (DIFFLEY et al., 1987; TURNER et al., 1996; TAYLOR et al., 2002). A carga parasitária de *T. gondii* é o maior contribuinte para a patogênese causada por este parasito em camundongos (MORDUE et al., 2001; GAVRILESCU e DENKERS, 2001), relacionados a super estimulação do sistema

imune (MORDUE *et al.*, 2001; GAVRILESCU e DENKERS, 2001; NGUYEN *et al.*, 2003), conduzindo a altos níveis de citocinas Th1, aumentada apoptose e danos orgânicos. Embora um taquizoíta da cepa tipo I seja suficiente para geração de alta carga parasitária e altos níveis de citocinas Th1, alta carga parasitária da cepa tipo II, gerado por aumento da inoculação conduzem a igual nível de citocinas e patologia (SAEJI *et al.*, 2005).

Em humanos são poucos os estudos que investigam a correlação entre o genótipo do parasito e as manifestações da doença causada por infecção por *T. gondii* (BOOTHROYD *et al.*, 2002). A cepa do tipo II está associada à maioria (81%) dos pacientes com toxoplasmose, enquanto os tipos I e III foram encontrados, respectivamente, em apenas 10% e 9% dos isolados de seres humanos (HOWE *et al.*, 1997). A tendência é associar a doença em seres humanos com parasitos do tipo II, já que parasitos deste tipo constituem pelo menos dois terços dos isolados em humanos (HOWE e SIBLEY, 1995). Grigg *et al.* (2001) mostraram que a cepa tipo I e algumas linhagens incomuns foram achadas em indivíduos imunocompetentes que sofrem de grave ou atípica toxoplasmose ocular nos EUA (GRIGG *et al.*, 2001). No caso do Brasil, a caracterização feita por Vallochi *et al.*, (2005) de parasitos presentes nas retinas de alguns indivíduos de São Paulo (SP) e de Erechim (RS) detectou predominantemente parasitos do tipo I. Outro estudo, recentemente publicado em colaboração com o nosso grupo, sugere que na população brasileira há uma diversidade clonal nas cepas isoladas de pacientes, inclusive de Erechim, em relação as cepas isoladas em outros estudos realizados na América do Norte e Europa (KHAN *et al.*, 2006). A linhagem tipo I tem também sido desproporcionalmente associada com toxoplasmose congênita grave na Europa (HOWE *et al.*, 1997; FUENTES *et al.*, 2001).

1.3 Transmissão

A infecção por *Toxoplasma* é geralmente adquirida por ingestão de alimento ou água contaminada por oocistos liberados por gatos, ou por alimento mal-cozido ou cru contendo cistos teciduais ou ainda, pela ingestão de taquizoítas encontrados no leite não pasteurizado, ovos, na saliva através de lambedura ou perdigotos, no esperma, transfusões sanguíneas, transplante de órgãos e congenitamente (BONAMETTI *et al.*, 1997; GARCIA *et al.*, 2003; MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

A carne utilizada para consumo humano pode conter cistos e servir como fonte de infecção pelo *T. gondii*. Diferentes inquéritos revelam que mais de 25% dos carneiros e dos

suínos apresentam-se infectados, sendo a carne de porco considerada a origem da transmissão mais comum nos Estados Unidos e sul do Brasil (HOLLAND, 2003). Na carne bovina o isolamento de cistos é mais raro, embora alguns autores tenham encontrado de 2 a 10% de soropositividade nestes animais (BONAMETTI, *et al.*, 1997). Água contaminada tem sido considerada a origem de epidemias graves por *T. gondii*. No estado do Paraná uma epidemia por *T. gondii* foi atribuída a reservatórios de água potável contaminadas com oocistos de gatos infectados (HOLLAND, 2003).

No Brasil, a alta taxa de gatos soropositivos prognostica forte contaminação do meio ambiente por oocistos de *T. gondii*, que irão levar a contaminação de alimentos e água fornecidos aos humanos. De fato, a água tem sido identificada como a maior origem de transmissão de *T. gondii* para humanos no Brasil (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; DE MOURA *et al.*, 2006). A alta contaminação do meio ambiente conduzirá inevitavelmente a alta taxa de infecção por *T. gondii* em hospedeiros intermediários e a consequência é o aumento de oportunidade de recombinação genética em gatos. Esta rara epidemiologia de transmissão de *T. gondii* conduziria e manteria a estrutura epidêmica da população do parasita no Brasil (PENA *et al.*, 2008).

1.4 Patologia

A infecção primária é geralmente assintomática, mas alguns pacientes podem apresentar linfadenopatia cervical ou ocular (GARCIA *et al.*, 2003). Infecções ocorridas durante a gravidez podem levar à morte do feto ou à toxoplasmose congênita, pela transmissão vertical do taquizoíta pela placenta, ocasionando hidrocefalia ou retinocoroidite (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000; GROSS, HOLPERT e GOEBEL, 2004). O parasito pode causar diferentes graus de gravidade, dependendo da virulência da cepa, da capacidade de resposta imune da mãe e do período gestacional (SPALDING *et al.*, 2003). A gravidade da doença é maior quando a mãe se infecta no início da gravidez, do que depois da trigésima semana, quando a forma da doença pode ser mais branda (MOZZATTO e SOEIBELMANN PROCIANO, 2003). A infecção fetal pode ser atenuada ou prevenida quando há tratamento materno após o diagnóstico precoce (SPALDING *et al.*, 2003).

A toxoplasmose pode passar despercebida no momento do nascimento, porém poderá se manifestar meses ou até anos depois. Nesses casos, as manifestações mais frequentes são retinocoroidite e alterações neurológicas. Nos casos mais graves de infecção congênita, o

recém-nascido pode apresentar modificação do volume craniano, calcificações intracerebrais e/ou convulsões. No soro do recém nascido, presença de títulos elevados de anticorpos IgG, que aumentam ou permanecem positivos em período de até 18 meses, é indicativo de toxoplasmose congênita, já que os que decrescem e tendem a se tornar negativos representam os anticorpos maternos de transferência passiva (SPALDING *et al.*, 2003).

Em pacientes imunossuprimidos com infecção crônica, o parasito pode causar toxoplasmose cerebral, resultado da reativação do cisto tecidual e reversão da forma bradizoíta em taquizoíta (GROSS, HOLPERT e GOEBEL, 2004).

Outra forma de transmissão é por transplante de órgão de um doador soropositivo para um soronegativo, no qual há a reativação da infecção latente, ocasionando doenças no coração, pulmão, rim, fígado e pâncreas (BROOKS e REMINGTON, 1986; ISRAELSKI e REMINGTON, 1993). A grande maioria das infecções adquiridas por indivíduos saudáveis é benigna e também assintomática ou com vagos sintomas. Linfadenopatia é a manifestação mais comum (LAPPALAINEN e HEDMAN, 2004).

A retinocoroidite toxoplásmica é considerada a uveíte posterior infecciosa mais comum (HOLLAND, 2003), inclusive na população humana brasileira (GARCIA *et al.*, 2003). As lesões oculares causadas pelo *T. gondii* são originadas tanto da infecção congênita quanto da infecção adquirida após o nascimento (SILVEIRA, *et al.*, 1988, GLASNER *et al.*, 1992). Na região Sul do Brasil são muitos os casos de infecção pós-natal (SILVEIRA *et al.*, 1988, 2001; HOLLAND, 2000) e, nos EUA, um estudo dos riscos da infecção concluiu que pelo menos dois terços dos casos de toxoplasmose ocular são causados pela infecção adquirida (GILBERT e STANFORD, 2000).

A doença ocular, denominada retinocoroidite toxoplásmica é caracterizada por uma lesão cicatricial de coloração castanha e atrofiada. É importante ressaltar que a lesão clássica causada pelo parasito inicia-se na retina neural e, somente com o desenvolvimento da resposta inflamatória, ela passa a envolver as demais camadas da retina, assim como a coróide (ROBERTS e MCLEOD, 1999). Todos os pacientes evoluem com perda de campo visual correspondente à interrupção de fibras nervosas da retina. O posicionamento da lesão também contribui para a perda de visão, o dano é maior se disco ótico e mácula foram atingidos.

A recidiva da lesão ocular ocorre tanto em casos de infecção adquirida quanto de infecção congênita. Em alguns pacientes, novas lesões primárias, que não derivaram de uma cicatriz, podem se desenvolver longe da cicatriz pré-existente em áreas da retina que tinham aparência clínica normal. Estas lesões recidivas parecem ser causadas pela liberação do parasito de tecidos císticos presentes na retina, disseminação do parasito presente em outros tecidos e/ou reinfecção do paciente (HOLLAND, 2003).

1.5 Resposta Imune ao Parasito

A infecção por *T. gondii* induz potente e persistente resposta imune protetora (ALEXANDER e HUNTER, 1998; DENKER e GAZZINELLI, 1998; YAP e SHER, 1999). Entretanto, a resposta imune não é suficiente para eliminação do parasito, havendo um balanço no qual hospedeiro e parasito mantém um equilíbrio que pode permanecer estável por toda vida do hospedeiro (LUFT e REMINGTON, 1992). O *T. gondii* causa efeitos de indução e supressão no sistema imune (DENKERS *et al.*, 2003B; SHAPIRA *et al.*, 2004). Esta dupla propriedade provavelmente conta para o notável sucesso do parasito nas populações humanas e animais.

A forte resposta imune mediada por células associada a infecções por *T. gondii* são determinadas por eventos que ocorrem durante encontros iniciais entre parasito e o sistema imune inato do hospedeiro. Essas interações celulares conduzem a ativação de células T e a diferenciação T helper 1 (Th1) dependente de Interleucina (IL)-12. Leucócitos polimorfonucleares e células dendríticas (DC) recentemente surgiram como peças-chaves na fase de indução da imunidade. Ambos os tipos celulares respondem diretamente ao *T. gondii*, secretando citocinas e quimiocinas (DENKER *et al.* 2004).

As DCs são consideradas células apresentadoras de antígeno (APCs) responsáveis pela resposta imune primária (STEINMAN, 1991). Depois de encontrar antígenos e em resposta a mediadores inflamatórios, DCs sofrem um processo de maturação caracterizado pelo aumento da expressão de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e moléculas co-estimulatórias (LARSEN *et al.*, 1990; STERILEN *et al.*, 1990; SALLUSTO *et al.*, 1995; CELLA, SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1997). Estas mudanças são acompanhadas por migração de células T dependentes para área do órgão linfóide secundários onde a DC madura estimula células T naive (LARSEN *et al.*, 1990; AUSTYN, 1992; INABA *et al.*, 1990). Alguns trabalhos sugerem que a interação entre a expressão de CD28 por células T e

expressão de CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) em APCs especializadas promove um importante sinal co-estimulatório. (FREEMAN *et al.*, 1993; LINSLEY e LEDBETTER, 1993). Ambas as moléculas de superfície CD80 e CD86 podem promover co-estimulação para proliferação de células T e produção de IL-12 (FREEMAN *et al.*, 1993; LEVINE *et al.*, 1995). No entanto, estas moléculas diferem em sua expressão em APCs. Enquanto DCs expressam ambos os ligantes co-estimulatórios, monócitos/macrófagos expressam constitutivamente apenas a molécula CD86 (AZUMA *et al.*, 1993). Células B em descanso têm baixos níveis de expressão de CD86 e insignificante expressão de CD80. (AZUMA *et al.*, 1993)

DCs imaturas do tipo CD8 α ⁻ estão concentrados na porta de entrada do corpo, tal como pele e superfície das mucosas, enquanto DC CD8 α ⁺ residem predominantemente em órgãos linfóides secundários (ANJUERE *et al.*, 1999; ARDAVIN, 2003). As DCs expressam receptores de reconhecimento padrão, tais como aqueles da família TLR (do inglês: toll like receptor), que permitem o reconhecimento de produtos patogênicos ou microbianos contendo motivos moleculares externos (WATTS e AMIGORENA, 2000; MEDZHITOV e JANEWAY, 2000). A maturação está associada com o cessamento da endocitose, produção de citocinas inflamatórias (incluindo IL-12 e TNF- α), migração para linfonodos, aumento na expressão de moléculas de superfície (MHC classe II, CD40, CD80 e CD86) e capacidade de DC madura em ativar células Th1 CD4⁺ (BANCHEREAU *et al.*, 2000; GUERMONPREZ *et al.*, 2002; MELLMAN e STEINMAN, 2001). A produção de IL-12 é particularmente importante na toxoplasmose, pois esta citocina estimula células NK (células “Natural Killer”) a produzir interferon (IFN)- γ e promovem desenvolvimento de células Th1 produtoras de IFN- γ . (GAZZINELLI *et al.*, 1994; HUNTER *et al.*, 1995; MACATONIA *et al.*, 1995).

Alguns estudos sugerem que a produção de IL-12 por DC requer um sinal inicial microbiano, bem como a interação CD40-CD40 ligante (CD40L) e de fato a exigência desses dois sinais é uma proteção contra liberação inapropriada de IL-12. (SEGUIN e KASPER, 1999; SUBAUSTE e WESSENDRAP, 2000). Isto explica a aumentada susceptibilidade de pacientes com Hiper-IgM, que possuem defeito na expressão de CD40L, à infecções por *T. gondii* e outras infecções oportunistas (SUBAUSTE *et al.*, 1999).

Enquanto alguns estudos defendem que são necessários os dois sinais para a produção de IL-12 pelas DCs, outros trabalhos apresentam que antígenos de *T. gondii* induzem síntese de IL-12 por estas células na ausência da interação CD40-CD40L (REIS e SOUSA *et al.*, 1997). No entanto, embora a ligação CD40 sozinha não induza a produção de IL-12, quando

estimulados com antígeno de *Toxoplasma* (conhecido como STAg) os níveis de citocinas liberados são bastante elevados (SCHULZ *et al.*, 2000). Em estudos com camundongos CD40L knock-out, os níveis de IL-12 sistêmicos estão baixos durante a infecção por *T. gondii*, no entanto, esta produção é suficiente para prover a síntese de IFN- γ necessário para sobrevivência desses camundongos à infecção aguda (REICHMANN *et al.*, 2000).

A habilidade de DC em polarizar linfócitos T recentemente ativadas para resposta Th1 ou Th2 já está bem estabelecido. Embora haja evidência que distintas populações de DC são especializadas na indução da resposta tipo 1 e tipo 2 (DC plasmocitóides e mielóides, respectivamente), é também conhecido que subpopulações de DC podem ativar resposta Th1 ou Th2 dependendo do antígeno microbiano e das citocinas presentes durante ativação das DCs (SHORTMAN e LIU, 2002; BOONSTRA *et al.*, 2003).

DCs CD11c⁺ purificadas do baço e linfonodos mesentéricos estimuladas com antígeno do parasito diferem na resposta induzida quando administrados em camundongos. Embora ambas induzam imunidade protetora, DCs do linfonodo mesentérico trafegam para o intestino de camundongos infectados onde geram resposta Th2 na mucosa. (BOURGUIN *et al.*, 1998; DIMIER-POISSON *et al.*, 2003). Alguns dados sugerem que o lisado de *T. gondii* contém antígenos capazes de induzir resposta Th1 e Th2 ou, alternativamente, que as mesmas moléculas microbianas induzem diferentes respostas na produção de citocinas dependendo da origem das DCs.

A resposta imune celular contra o *T. gondii* tem sido bastante estudada em camundongos e envolve o sistema imune inato (macrófagos, células NK e células polimorfonucleares – neutrófilos e eosinófilos) e o adaptativo (linfócitos T). Os linfócitos T são os principais mediadores da resistência adquirida contra o *T. gondii*, confirmado por experimentos em camundongos atímicos que são extremamente suscetíveis às linhagens virulentas e avirulentas do parasito (LINDBERG e FRENKEL, 1977; SCHLUTER *et al.*, 1991). A resistência à infecção em camundongos é dependente tanto dos linfócitos T CD4⁺ quanto dos T CD8⁺, mas em alguns modelos murinos, linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ são os principais efetores da imunidade *in vivo* (DENKERS *et al.*, 1993), enquanto que as células T CD4⁺ parecem possuir um efeito sinérgico na indução da imunidade através do aumento da síntese de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ (SAYLES e JOHNSON, 1996). Além disso, a depleção *in vivo* dos linfócitos T CD8⁺ converte camundongos resistentes em suscetíveis à infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1993). Estes resultados são consistentes com a

importância dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos restritos ao MHC na regulação da formação dos cistos.

O estudo da infecção com certos organismos tem mostrado correlação entre os tipos de citocinas produzidas por célula T (HEINZEL *et al.*, 1989), havendo importância no papel que o IFN- γ tem na indução da imunidade protetora contra microorganismos intracelulares (KAUFMANN, 1993), como o *T. gondii* (SUBAUSTE e REMINGTON, 1993; GAZZINELLI, DENKERS e SHER, 1993). SUBAUSTE e WESSENDRAP (2000) demonstraram que a sinalização CD28-CD80/CD86 regula a produção de IFN- γ , e que a interação CD40L-CD40 regula a secreção de IL-12 e IFN- γ durante o contato entre células T e monócitos infectados com *T. gondii* (SUBAUSTE, DE WALL MALEFYT e FUH, 1998; SUBAUSTE *et al.*, 1999).

O IFN- γ tem papel importante tanto na imunidade adquirida em infecções agudas como no controle do crescimento do parasito em animais cronicamente infectados (GAZZINELLI *et al.*, 1991, 1996; SUZUKI, CONLEY e REMINGTON, *et al.*, 1989). Mais recentemente, camundongos knock-out para certos genes, tais como IFN- γ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , têm ajudado a estabelecer a importância desses no controle da toxoplasmose experimental. Ausência de algumas dessas citocinas pró inflamatórias resultam em mortalidade aumentada durante infecção resultando em crescimento descontrolado de taquizoítas (GAZZINELLI *et al.*, 1994; SHER *et al.*, 1993). Apesar do papel protetor dessas citocinas do tipo I durante infecção por *T. gondii*, é bem conhecido que a superprodução desses mesmos fatores podem também levar a patologias no hospedeiro (ARAÚJO *et al.*, 2001)

Embora citocinas Th1 sejam essenciais para o controle do parasito, esta resposta deve ser finamente regulada para prevenir imunopatologias letais. Em camundongos IL-10 knock-out, danos ao fígado e morte ocorrem quando o camundongo é desafiado com cepa não letal do tipo II, como consequência de superprodução de IL-12, IFN- γ e TNF- α . (GAZZINELLI *et al.*, 1996). O efeito antiinflamatório do IL-10 é primariamente atribuído a sua habilidade de inibir funções de células acessórias requeridas para a resposta de células T. Portanto, IL-10 pode inibir produção de citocinas por células acessórias tais como TNF- α , IL-1 e IL-12, que são requeridas para ótima produção de IFN- γ (D'ANDREA *et al.*, 1991; FIRENTINO *et al.*, 1989; HASKO *et al.*, 1998; MOORE *et al.*, 2001; TRIP *et al.*, 1993).

Mordue *et al.* (2001), mostraram que os altos níveis de citocinas Th1 durante toxoplasmose letal em camundongo selvagem não são devido à ausência de IL-10, uma vez que esta citocina está em altos níveis no soro durante infecção letal.

Gavrilescu e Denkers (2001; 2003) sugeriram que infecções com cepas altamente virulentas de *T. gondii* resultam em super produção de IFN- γ e altos níveis de apoptose, em contraste com cepas de baixa virulência. Sendo assim, camundongos infectados com taquizoítas da cepa tipo I (RH) apresentam níveis aumentados de morte celular por apoptose no baço imediatamente antes da morte. No entanto, este fato não parece ser diretamente atribuído a destruição de tecidos induzida pelo parasito, mas é causada por altos níveis de mediadores pró inflamatórios induzidos pela cepa RH. Portanto, a patologia durante a toxoplasmose, deve-se, em parte ao resultado de uma morte celular por apoptose descontrolada induzida por cepa virulenta.

Pacientes com diagnóstico de toxoplasmose ocular adquirida têm alta estimulação das células T em resposta a antígenos do parasita, secretando níveis de IL-1, IL-10 e TNF- α mais alto que indivíduos assintomáticos. Por outro lado, indivíduos assintomáticos secretam níveis mais altos de IL-12 do que pacientes com toxoplasmose adquirida (YAMAMOTO *et al.*, 2000). As citocinas derivadas de linfócitos (IL-2 e IFN- γ) estão diminuídas em indivíduos que apresentam doença congênita, o que sugere que a resistência ao desenvolvimento de lesões oculares está associada à habilidade de produzir IL-12 e IFN- γ contra o parasito (YAMAMOTO *et al.*, 2000). Esta diminuição da resposta ao parasito por células T de pacientes com doença congênita não ocorreu por deleção das células T através da exposição ao antígeno do parasita durante o período pré-natal (YAMAMOTO *et al.*, 2000; VALLOCHI *et al.*, 2002).

A resposta imune envolve várias vias para iniciar e eliminar a constante ameaça causada por patógenos, prevenindo contra danos teciduais e doença sistêmica, sendo a polarização da resposta vista em vários níveis (SHER e COFFMAN 1992; STEINMAN 2003). Isótipos de imunoglobulinas representam tal exemplo de polarização da função imune em resposta à desafios específicos e estão ligados a polarização Th1 e Th2. Respostas do tipo Th1 são otimizadas para facilitar a eliminação de patógenos intracelulares e liberação de citocinas como IFN- γ resultante da ativação de macrófagos, aumentando a produção de subclasses específicas de anticorpos, como IgG2a e IgG3. Por outro lado citocinas Th2, como IL-4 e IL-5, geralmente produzem respostas a desafios microbianos extracelulares e conduzem a

aumento da ativação de células B produzindo IgG1 e IgE e secretando IgA (MOSMANN e COFFMAN, 1989; FINKELMAN *et al.*, 1990).

O *T. gondii* estimula uma forte e persistente resposta humoral em todos hospedeiros, anticorpos contra proteínas do parasito permanecem com títulos elevados por toda a vida do hospedeiro e estão presentes em pacientes com essencialmente todas as manifestações clínicas de infecção, variando de adquirida para congênita e, ainda, nos casos de infecção assintomática (FRENKEL *et al.*, 1991; ASAI *et al.*, 1992). Dados na literatura mostram que a resposta imune humoral contra o *T. gondii* é cepa-específica. Por exemplo, 5 de 5 anticorpos monoclonais de camundongos (MAbs) para SAG2A isolados depois de uma infecção natural eram alelo-específicos (i.e., os anticorpos reconhecem o alelo expressado por tipo I e III, mas não o tipo II, embora todos os 3 tipos expressem níveis aproximadamente iguais da proteína de SAG2A) (PARMLEY *et al.*, 1994). Conseqüentemente, epítomos polimórficos parecem ser altamente imunogênicos e possivelmente imunodominantes (KONG *et al.*, 2003).

Embora seja controversa a participação dos anticorpos na resistência à infecção pelo *T. gondii*, modelos experimentais em camundongos, ratos e cobaias têm produzido diferentes resultados a respeito do potencial protetor dos anticorpos anti-*T. gondii* que pode ser devido a diferente herança genética dos hospedeiros e/ou as diferentes cepas do parasito. Enquanto alguns pesquisadores mostraram a não proteção contra a infecção com cepas virulentas de *T. gondii* (FOSTER e MCCULLOCH, 1968; GIL e PRAKASH, 1970), outros mostraram a proteção pela transferência passiva do soro imune ou de anticorpos monoclonais específicos a proteínas do *T. gondii* para camundongos infectados com cepas de virulência moderada (MASIHI e WERNER, 1978; JOHNSON, MCDONALD e NEOH *et al.*, 1983; SHARMA *et al.*, 1984).

Em infecções humanas por *T. gondii*, perfil sorológico tem sido utilizado como uma alternativa para distinguir entre as fases da doença. Para distinguir entre a toxoplasmose ocular adquirida recentemente da toxoplasmose ocular congênita faz-se comparação de anticorpos anti-*T. gondii* IgA, IgM ou IgE, no qual a presença destes anticorpos pode ser considerada uma forte evidência de infecção primária recente (GÓMEZ-MARÍN *et al.*, 2000).

Na toxoplasmose adquirida a combinação dos três isótipos de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) podem ajudar a distinguir uma infecção antiga (IgG isolado) e uma infecção recente (IgG, IgA e IgM coexistindo). No entanto, em adição a variações individuais da

resposta imune, anti-*T. gondii* IgM e IgA podem persistir por mais de 1 ano após a infecção, impedindo a precisa identificação da infecção (RONDAY *et al.*, 1999).

1.6 Toxoplasmose em Erechim

Estudos realizados na cidade de Erechim, localizada em uma região agrícola do Rio Grande do Sul, tem proporcionado importantes observações acerca da infecção por *T. gondii*, pois esta região tem alta prevalência de toxoplasmose, cerca de 85% da população com sorologia positiva (SILVEIRA *et al.*, 1988; GLASNER *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 2000; VALLOCHI *et al.*, 2001, 2002, 2004).

A região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, colonizada por descendentes de imigrantes europeus, principalmente italianos, alemães e poloneses, apresenta estrutura econômica associada à agropecuária, com a cadeia produtiva ligada ao processamento de suínos. A região apresenta a maior ocorrência mundial de toxoplasmose ocular, atribuída à forma de retinocoroidite toxoplásmica adquirida, com a prevalência de 18% na população rural de Erechim (GLASNER *et al.*, 1992).

Silveira, Silveira e Silveira (1975) fizeram o primeiro relato de casos de toxoplasmose em famílias na região de Erechim e na cidade de Bogotá, Colômbia, na Clínica Barraquer. Mais de 500 famílias, com mais de um irmão não-gêmeo apresentando retinocoroidite toxoplásmica, foram identificadas na Clínica Silveira até janeiro de 2002 (SILVEIRA, 2002).

Através de estudo de caso-controle realizado em Erechim foram verificados os principais fatores de risco e fontes de infecção do *T. gondii*. Os dados do estudo apontam o contato direto no solo, seja ele no campo ou em jardinagem domiciliar, e o hábito de comer carne de suínos e ovinos mal-cozida, como principais fontes de infecção associadas às infecções recentes. A pesquisa também revela que há maior soroprevalência entre adultos e crianças do sexo masculino, mulheres multíparas e na população da zona rural. Entre os indivíduos domiciliados na zona urbana foi verificada baixa associação com a infecção (JONES *et al.*, 2006). É provável que as campanhas de saúde pública estejam educando e conscientizando a população urbana, minimizando a exposição ao parasito.

Várias hipóteses têm sido elaboradas para explicar a alta prevalência de toxoplasmose ocular nesta região, dentre elas: 1) exposição crônica e intensa ao organismo, que possa aumentar a chance de que um indivíduo com infecção adquirida venha a desenvolver

complicações oculares; 2) genética do hospedeiro ou outras diferenças que possam predispor ao desenvolvimento de uveítes; 3) outros agentes ou co-fatores que possam interagir com a infecção por *T. gondii* e alterar a história natural da doença; 4) a existência de uma cepa incomum de *T. gondii* que seja endêmica na região de Erechim (SILVEIRA, 2002). Assim, a alta taxa de infecção (cerca de 80% dos adultos) nesta região do Sul do Brasil faz a população local um alvo ideal para estudo da resposta imune contra o parasito, já que os pacientes com lesão ocular tem tido acompanhamento médico constante, no qual sabe-se a história clínica do paciente e da doença. Devido a este acompanhamento, é possível identificar indivíduos infectados com *T. gondii* intra-útero e identificar indivíduos com infecção adquirida depois do nascimento, o que permite estudar as diferenças na resposta imune (VALLOCHI *et al.*, 2002).

Como parte dos estudos sobre a toxoplasmose ocular na população de Erechim realizados em nosso laboratório, concluímos recentemente um trabalho, em colaboração com o Doutor Michael Grigg, para caracterizar as cepas do *T. gondii* que infectam esta população. Neste estudo, utilizamos o método de tipagem sorológica das cepas (KONG *et al.*, 2003) por tratar-se de um método não-invasivo, rápido e extremamente sensível para identificar o tipo de cepa do parasito em qualquer estado de doença e em diferentes fases de infecção. Foram analisadas pelo método de ELISA amostras de soro de indivíduos em diferentes fases da infecção, com ou sem lesão ocular, para a pesquisa dos isótipos específicos e contra peptídeos recombinantes de regiões polimórficas (GRA6 e GRA7) do parasito. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que diferentes sorotipos de cepas estão infectando os pacientes de Erechim e que um sorotipo atípico e único, em relação a outras populações estudadas, está associado à toxoplasmose ocular grave (RIOS *et al.*, in press).

O conhecimento prévio da possibilidade de que endemicidade para o *T. gondii* em Erechim está associada à presença de diferentes linhagens do parasito e, ao mesmo tempo, que diferentes genótipos podem estar implicados com diferentes manifestações clínicas, nos alerta para a necessidade do isolamento *in vivo* e *in vitro* destas cepas e a posterior caracterização biológica do parasito, para o melhor entendimento dos mecanismos do hospedeiro e do parasito que estão relacionados com o desenvolvimento da toxoplasmose.

Os dados até então apresentados na literatura sugerem que as diferenças na geração de determinados tipos de células do sistema imune podem permitir um comportamento cepa-específico na resolução da infecção ou na patogenia da infecção. É bastante evidente que ocorrem diferenças significativas na resposta do hospedeiro para diferentes linhagens de *T.*

gondii. Por isso, existe um considerável interesse em determinar como um genótipo particular de *T. gondii* pode diferir em sua capacidade de induzir patologia ou ocorrência em determinada espécie animal. O entendimento de fatores genéticos que influenciam na virulência do *T. gondii* e no mecanismo de seleção de genótipos de acordo com a espécie do hospedeiro pode contribuir para o desenvolvimento de projetos terapêuticos que eliminem a transmissão ou cura da doença.

Neste estudo investigaremos a população de Erechim, onde podem ser encontrados casos de infecção aguda e crônica, com lesão ocular branda ou grave clinicamente bem caracterizados. O isolamento, a caracterização genotípica e o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune cepa-específica do hospedeiro contra o *T. gondii*, a partir de amostras desta população, serão de fundamental importância para a continuação do estudo que o nosso laboratório vem desenvolvendo na busca de elucidar os fatores envolvidos no parasito e no hospedeiro que determinam a ocorrência da toxoplasmose ocular, fazendo com que esta população detenha a maior prevalência dessa doença no mundo.

2 Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é a caracterização funcional de cepas de *T. gondii* através do estudo das populações de células esplênicas de camundongos infectados, bem como o isolamento e caracterização molecular das cepas de *T. gondii* que infectam a população de Erechim, causando toxoplasmose ocular.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar cepas de *T. gondii* a partir de amostra de sangue de pacientes com toxoplasmose ocular;
- Investigar a resposta imune contra *T. gondii* avaliando a expansão de DC esplênicas CD11c⁺ expressando CD40, CD80, CD86 e MHC classe II em camundongos infectados pelas cepas tipo I (RH), tipo II (ME49) e tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii*;
- Analisar a população de células CD4⁺ e CD8⁺ em camundongos infectados pelas cepas tipo I (RH), tipo II (ME49) e tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii*;
- Verificar a produção das citocinas IL-12p40, IFN- γ e IL-10 em cultura de células esplênicas de camundongos infectados pelas cepas tipo I (RH), tipo II (ME49) e tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii*;

3 Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Pacientes

Foi utilizado 20 ml de sangue de 9 (nove) pacientes provenientes da Clínica Silveira em Erechim e 3 (três) pacientes oriundos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Todos esses pacientes foram diagnosticados com toxoplasmose ocular aguda, alguns apresentando lesões ativas em um dos olhos, que ainda não haviam iniciado tratamento.

Esse material foi utilizado para obtenção de plasma e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), bem como para extração de DNA e pesquisa de taquizoítas circulantes.

Os protocolos descritos foram previamente aprovados pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, concordando com a participação no estudo (Anexo 01).

O diagnóstico clínico da toxoplasmose ocular dos pacientes de Erechim foi feito pelo Dr. Cláudio Silveira utilizando critérios previamente descritos (SILVEIRA *et al.*, 1988; 2001). Resumidamente, o diagnóstico da infecção foi feito baseado na história, exame clínico do paciente, retinografia e perfil sorológico.

3.2 Obtenção de plasma e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Foram coletadas amostras de sangue venoso, em tubos BD Vacutainer contendo heparina. A partir destas amostras foi realizada a centrifugação (500 g/ 5 minutos) para separação de plasma que foi aliquoteado e congelado (-20 ° C). PBMCs foram separadas por gradiente de densidade em solução de Isolymp (Gallard-Schleisinger Industries - Carle Place, NY, EUA). Após a separação, as células foram lavadas 3 vezes em meio de cultura DMEM suplementado com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 0,1mM de vitaminas, 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de gentamicina, 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sódio, todos da Gibco BRL (Rockville, USA) e 5% de soro humano.

Estas células foram utilizadas para: 1) infecção de camundongos C57Bl/6 fêmeas; e 2) infecção de cultura de células LLC-MK2 (RHesus monkey kidney continuous cell line – American Type Culture Collection (ATCC) CCL7.1).

3.3 Cultura de LLCMK2 (ATCC CCL-7)

LLCMK2 foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 0,1mM de vitaminas, 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de gentamicina, 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sódio, todos da Gibco BRL (Rockville, USA) e 5% de soro fetal bovino (Hyclone, USA até a confluência em garrafas de cultura de 25cm².

Para expansão da cultura, desprezou-se o meio de cultura da garrafa e lavou-se a garrafa com PBS 1x estéril, em seguida adicionou-se 2ml de tripsina por mais ou menos 4 minutos para descolamento das células. As células foram recolhidas com uma pipeta de 5ml, e transferidas para um tubo falcon de 50ml contendo 10ml de meio de cultura DMEM suplementado com 5% soro fetal bovino. Em seguida, 2ml da solução de células foram adicionadas às garrafas 25cm² e completadas com 3ml de DMEM suplementado com 5%SFB. A expansão dessas células foi realizada a cada 10 dias

3.4 Manutenção da cepa tipo I (RH) de *T. gondii*

Uma garrafa de cultura de 25cm² contendo células LLCMK2 foi infectada com 1x10⁶ taquizoítas da cepa RH. Após 2-3 dias já era possível observar células infectadas, e em 4-5 dias taquizoítas extracelulares eram visíveis na cultura. A troca de meio foi feita após 3 ou 4 dias da infecção das LLCMK2.

Os repiques foram realizados transferindo 0,5ml de meio de cultura com taquizoítas extracelulares para garrafas de LLCMK2 de 25cm² a cada dez/quinze dias.

3.5 Infecção de camundongos pela cepa tipo I (RH), tipo II (ME49) e tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii*

Fêmeas de camundongos das linhagens C57Bl/6 (6 a 8 semanas) foram infectadas intraperitonealmente com 1x10⁴ taquizoítas da cepa tipo I (RH) e tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii*. A evolução da doença foi observada e vimos que, com estas cepas, o animal sobrevive

por no máximo 7 dias. Portanto, a cada 6 dias foi realizado o repique das cepas em outro camundongo através de lavagem peritoneal como descrito abaixo.

A cepa TgCatBr71(Tipo BrI) de *T. gondii* foi cedida pela prof^a Solange Maria Gennari. Esta cepa virulenta foi isolada a partir de gatos infectados por *T. gondii*, que foram capturados pelos Centros de Zoonoses de cidades localizadas no estado de São Paulo. A partir de tecidos dos gatos, fez-se bioensaio em camundongos, no qual se conseguiu o isolamento das cepas para posterior genotipagem. A genotipagem foi feita por *PCR-RFLP*, utilizando os marcadores genéticos SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA-6, c-22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007b). A virulência das cepas foi definida pela mortalidade de camundongos positivamente infectados. Quando havia 100% de mortalidade entres os camundongos infectados no período de 4 semanas a cepa era classificada com virulenta; com mais que 30% e menos de 100% de mortalidade considerada intermediariamente virulenta; e não virulenta quando a mortalidade era igual ou menor que 30%. (PENA et al., 2006).

Fêmeas de C57Bl/6 também foram mantidas infectadas com cepa de *T. gondii* tipo II (ME49), porém o repique desta cepa cistogênica era feita mensalmente por macerado de cérebro, como descrito abaixo.

Taquizoítas da linhagem RH (tipo I) são freqüentemente letais em camundongos durante a fase aguda da doença (HOWE *et al.*, 1996; SIBLEY *et al.*, 2002). Entretanto, as linhagens menos virulentas, como a tipo II (ME49), que normalmente não matam o hospedeiro, estabelecem infecções crônicas associadas com formação de cistos contendo bradizoítas em tecidos do cérebro e músculo esquelético (BOOTHROYD, 1993; HOWE *et al.*, 1997). Em contraste com camundongos infectados com cepa do tipo II, no qual a sobrevivência é maior, camundongos infectados com a cepa RH (tipo I) rapidamente morrem (BOOTHROYD, 1993). Mat e met

Para tentar isolar o parasita a partir do sangue dos pacientes, foram infectados de dois a três animais com 1×10^6 a 5×10^6 de PBMC de cada paciente.

Todos os protocolos descritos foram previamente aprovados pela comissão de ética em pesquisa com animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

3.6 Obtenção e manutenção das cepas tipo I (RH) e tipo II (ME49) e Tipo BrI (TgCatBr71) em camundongos

Camundongos infectados com taquizóitas (RH e TgCatBr71) foram sacrificados em câmara de CO₂. Fez-se punção cardíaca para retirada de sangue e para obtenção de soro, que foram armazenados a -20 °C até utilização. Em seguida, fez-se uma laparotomia mediana e injetou-se na região abdominal 3 ml de DMEM e aspirou-se, em seguida o líquido peritoneal. O líquido foi então transferido para tubo falcon de 15 ml e completado com meio DMEM. Fez-se uma primeira centrifugação a baixa velocidade para baixar células (70g por 5 minutos), coletou-se o líquido em outro tubo de 15 ml, centrifugando o material a 590g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado em 6% de hipoclorito de sódio e o pellet ressuspendido em PBS 1x, centrifugado novamente a 590g/10min e ressuspendido em 5 ml de PBS 1x. Em câmara de Newbauer, contou-se o número de taquizóitas e ajustou-se a concentração de 1×10^4 taquizóitas em um volume de 200µl para ser inoculado em camundongos.

Camundongos infectados com cistos (ME49) foram também sacrificados em câmara de CO₂. Fez-se punção cardíaca para obtenção de soro que foram armazenados a -20 °C até utilização. Em seguida abriu-se a região craniana cuidadosamente para não perfurar o cérebro. Retirou-se o cérebro colocando-o dentro de uma seringa de 5ml com agulha (21-22G) contendo 3ml de PBS 1x. Macerou-se o cérebro passando-o várias vezes pela seringa. O macerado foi recolhido em um tubo falcon de 15 ml e visualizou-se os cistos entre lâmina e lamínula. Fez-se a contagem de cistos contidos na lâmina por varredura e o volume ajustado para que se tenha 10 cistos em 200ul para inoculação intraperitoneal nos camundongos.

3.7 Obtenção de células esplênicas de camundongos

Camundongos C57Bl/6 foram sacrificados como descrito anteriormente, tiveram o baço retirado e colocado em placa de Petri. Em seguida, macerou-se o baço assepticamente, utilizando meio DMEM (5 ml) para auxiliar na maceração, sendo recolhido o sobrenadante em tubo falcon de 50ml e centrifugado a 1500rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado em 6% de hipoclorito de sódio e o pellet ressuspendido em 2ml de solução de lise de hemácias por 4 min. Após este período, completou-se o tubo com PBS 1x e fez-se uma nova centrifugação. Em seguida, adicionou-se 5 ml de meio de cultura DMEM suplementado com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 0,1mM de vitaminas, 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de gentamicina, 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sódio, todos da

Gibco BRL (Rockville, USA) e 5% de soro fetal bovino (Hyclone, USA). Após contagem do número de células em câmara de Neubauer, a concentração de células foi ajustada conforme protocolo a ser utilizado.

3.8 Preparação do antígeno do *Toxoplasma gondii* - STAg (extrato solúvel de taquizoíta)

Taquizoítas da cepa RH foram utilizados como fonte de antígenos solúveis. Os parasitas foram mantidos em cultura de LLCMK2 (American Type Culture Collection ATCC CCL7.1) a 37 °C. Para a preparação dos antígenos solúveis, os parasitas foram recuperados das culturas e passados várias vezes por uma seringa com agulha gauge 27. Os taquizoítas foram separados das eventuais células LLC-MK2 em suspensão por centrifugação de baixa velocidade (70g por 5 minutos) e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 590g por 10 minutos. Os parasitas no precipitado foram lisados por ciclos de congelamento e de descongelamento (-196 °C e 37 °C, respectivamente). A lise foi completada após 4 ciclos de ultra-som usando uma micro-sonda (Microson™, Misonix Inc., Farmingdale, NY, EUA). O homogenato resultante foi centrifugado a 10.000g por 5 minutos. O sobrenadante obtido contém as proteínas solúveis do parasita e é denominado STAg (Soluble *Toxoplasma* Antigen – antígenos solúveis de *Toxoplasma*). A concentração protéica foi determinada pelo kit da Pierce (Rockford, IL, USA) utilizando albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemicals Company, St. Louis, MO, EUA) como padrão. As amostras foram filtradas usando microfiltros de 0,22µm (Millipore), aliquotadas e acondicionadas a -80 °C até o uso.

3.9 Cultura de células esplênicas para avaliação da produção de citocinas

Para a dosagem de citocinas utilizou-se 2×10^6 de células esplênicas de camundongos controle negativo (não infectados) e infectados com as cepas tipo I (RH) e tipo II (ME49) em diferentes tempos de infecção. Essas células foram incubadas em placa de 24 poços (Corning, NY, EUA) em volume final de 1 ml mantidas por 48 e 72 horas sem estímulo, com 10µg/ml de STAg e 2,5µg/ml de Concanavalina A (ConA), sendo após este período coletado o sobrenadante e estocado a -80 °C até o momento da dosagem de citocinas. No sobrenadante recolhido após 48 horas foi dosado IL-12p40 e no sobrenadante de 72 horas, IFN-γ e IL-10.

3.10 Dosagem de citocinas em cultura de células esplênicas

A análise da produção de IL-10, IL-12p40 e IFN- γ foi realizada utilizando-se o kit comercial BD OptEIA da BD Biosciences (San Diego, CA, EUA). O protocolo utilizado para a dosagem das citocinas IL-10 e IL-12p40 foi o mesmo (descrito abaixo), variando-se apenas a concentração inicial utilizada para a obtenção da curva padrão de cada uma das citocinas.

Placas duras com propriedade de alta ligação (Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50 μ l do anticorpo de captura diluído em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) por 18 horas à 4 °C . Após esse período, os poços foram bloqueados por 1 hora com 100 μ l de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 10% de soro fetal bovino. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T e em cada poço foram adicionados 50 μ l das amostras ou do recombinante murino (IL-10 e IL-12p40) em diluições seriadas a partir de 4000 pg/ml para IL-10 e 1000 pg/ml para IL-12p40 em meio DMEM suplementado. As placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e após o período de incubação, foram realizadas 4 lavagens com PBS-T. Aos poços foram adicionados 50 μ l de uma solução contendo o anticorpo de detecção biotilado e estreptoavidina conjugada à peroxidase, permanecendo por um período de 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T e 50 μ l da solução TMB (Pharmigen, San Diego, USA), foi adicionado a cada poço, seguido de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ l de solução 1M de H₃PO₄. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm.

Para a dosagem da citocina IFN- γ foi utilizado o mesmo protocolo descrito acima, sendo modificado o diluente do anticorpo de captura, que ao invés do tampão fosfato, utilizou-se o tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6) e para o bloqueio o tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20 e 5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemicals Company, St. Louis, MO, EUA). O recombinante murino teve diluição seriada a partir de 2000pg/ml. O limite de detecção para as citocinas IL-10 e IFN- γ foi de 31,3 pg/ml e para IL-12p40 de 15,6pg/ml.

3.11 Citometria de fluxo

Para avaliar a expressão de moléculas de superfície, 2×10^6 células esplênicas foram incubadas com 80 μ l de sobrenadante de cultura do hibridoma 24G2 contendo anticorpos anti-CD16/32 (bloqueador do receptor Fc) durante trinta minutos a 4 °C. A seguir, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (FITC, PE) específicos para as moléculas de superfície de interesse por 30 minutos.

Para avaliação da porcentagem de células $CD4^+$ e de células $CD8^+$ utilizou-se os anticorpos monoclonais: anti-CD4-FITC ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células) e anti-CD8-PE ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células).

Para marcação de células dendríticas utilizou-se os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD11c-PE ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células), anti-CD40-FITC ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células), anti-CD80-FITC ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células), anti-CD86-FITC ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células) e anti- MHC classe II (I-A^b) –FITC ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células). Como controle isotípico foram utilizados anticorpos do mesmo isótipo contra antígenos não relacionados conjugados aos respectivos fluorocromos. Foram utilizados os anticorpos monoclonais dos seguintes isótipos: IgG2a e IgG2b de rato e IgG1 e IgG2 de hamster.

Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) e ressuspendidas em 300 μ l do mesmo tampão. A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton e Dickinson, Mountain View, CA), utilizando-se o software FlowJo v.7.2. (Tree Star). Foram adquiridos 50.000 eventos $CD4^+ CD8^+$, e 10.000 eventos $CD11c^+$.

3.12 Extração de DNA genômico

Para extração de DNA foi utilizado o Kit QIAamp DNA Blood Midi (Qiagen, Valencia, CA). Em um tubo de 15 ml foi adicionado 100 μ l de Qiagen protease e de 0,3 a 1 ml de sangue que foram brevemente misturados. Em seguida, adicionou-se 1,2 ml de tampão Qiagen AL. O tubo foi então invertido quinze vezes, acompanhado de ligeira agitação por ao menos um minuto e incubação a 70 °C por dez minutos. Após incubação, acrescento-se 1 ml de etanol (96 – 100%) ao tubo, invertendo-o dez vezes e novamente agitando-o vigorosamente.

Após transferir toda a solução para dentro da coluna inserida em novo tubo de 15 ml, centrifugou-se por três minutos a 3000rpm. Em seguida, o filtrado foi descartado e adicionado à coluna 2 ml do tampão Qiagen AW1 e realizado nova centrifugação a 5000rpm por um minuto. Adicionou-se então 2 ml do tampão Qiagen AW2 e repetiu-se a centrifugação anterior por 15 minutos.

Após centrifugação, a coluna foi transferida para novo tubo de 15 ml e acrescentado 200µl de água destilada que foram incubados por cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugado por 5000rpm por dois minutos. O filtrado (DNA) foi transferido para um eppendorf e estocado a -20 °C.

Para extração de DNA a partir do cérebro dos camundongos, utilizamos este mesmo kit, onde foi adicionado 200µl da protease Qiagen em 500µl do macerado de cérebro.

Os DNAs extraídos foram quantificados no comprimento de onda de 260 e de 280nm por espectrofotometria, utilizando o software e o aparelho NanoDrop™ 1000 da Thermo Scientific.

3.13 Reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) e de Nested- PCR

Para a reação de PCR foram utilizados os primers externos e internos do gene B1 Grigg (seqüência descrita abaixo – Tabela 01). As amplificações foram executadas em um volume final de 50µl, contendo 20ng de DNA genômico, 0,10pmol de cada primer, 0,1mM dNTP (Invitrogen), 5µL de tampão de PCR, 2mM MgCl₂, 1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Todos os conjuntos de iniciadores foram utilizados para amplificações no termociclador (Perkin-Elmer Gen Amp PCR system 2400) usando as seguintes condições de amplificação: 94 °C/5min, 35 ciclos de 94 °C/30seg; 62 °C/30seg; 72 °C/45seg e 72 °C/10min, sendo obtidos fragmentos de 530pb. Um microlitros deste PCR inicial foi o molde para o segundo PCR, utilizando os primers internos apropriados e as mesmas condições do primeiro PCR descritas acima. Os produtos da reação do segundo PCR foram corridos em um gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo.

Tabela 01 – Sequências de primers.

Marcadores Genéticos	Forward externo (Fext); Forward interno (Fint)	Reverse externo (Rext); Reverse interno (Rint)
B1 Grigg*	Fext TGGTCTGTCCTATCGCAACG Fint TCTTCCCAGACGTGGATTTTC	Rext ACGGATGCAGTTCCTTTCTG Rint CTCGACAATACGCTGCTTGA

Fonte: *GRIGG *et al.*, 2001.

3.14 Análise Estatística

Foram determinados parâmetros estatísticos (média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo) para todos os resultados dos experimentos realizados.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* computacional *Graphpad Prism (Graphpad Software Incorporation)* versão 4.0. Os testes usados foram o ANOVA, seguido pelo teste Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

4 Resultados

4 Resultados

4.1 Infecção de camundongos com as cepas tipo I (RH), tipo II (ME49) e Tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii*

Com o intuito de estabelecer como cepas diferentes de *T. gondii* se desenvolvem em camundongos C57Bl/6, que são animais susceptíveis a esta doença, tais camundongos foram mantidos infectados com a cepa tipo I (RH), com a cepa tipo II (ME49) e com a cepa tipo BrI (TgCatBr71), que é uma cepa virulenta isolada a partir de gatos domésticos infectado por *T. gondii* no Brasil. A linhagem de camundongos C57Bl/6, por ser susceptível a infecção por *T. gondii*, sucumbe rapidamente à doença, quando infectado por uma cepa virulenta. Os primeiros sintomas da infecção por esta cepa são: pêlos eriçados (a partir do quarto dia de infecção) e letargia. Esses camundongos, infectados com 1×10^4 taquizoítas, tanto da cepa tipo I (RH) quanto da cepa tipo BrI (TgCatBr71), sobrevivem sete ou oito dias após a infecção.

Camundongos C57Bl/6 também foram mantidos infectados com a cepa tipo II (ME49). Por ser uma cepa menos virulenta e cistogênica, os animais infectados com ela não sucumbem tão rapidamente à doença, permanecendo vivos por um período de dois meses quando infectados com 10 cistos. Os sintomas da doença não são tão claros quanto dos animais infectados com as cepas virulentas, porém eles podem apresentar sinais de desorientação, debilidade e perda de peso significativa.

4.2 Confirmação da infecção por *T. gondii* através de reação de nested PCR

Como descrito nos Material & Métodos, camundongos C57Bl/6 foram inoculados com o PBMC dos pacientes soropositivos para toxoplasmose. Esses animais foram acompanhados dia a dia por um período de 45 dias a procura de algum sintoma de infecção por *T. gondii*. Após esse período os animais foram sacrificados, sendo realizada punção cardíaca para obtenção de plasma e extração de DNA e retirou-se o cérebro para pesquisa em microscópio pelo cisto de *T. gondii* e extração de DNA para confirmação da infecção.

Utilizando primers externos e internos para a reação de nested PCR para amplificação do gene B1, confirmou-se a presença ou ausência do DNA do parasita a partir do DNA extraído do sangue e do cérebro dos camundongos inoculados com o PBMC dos pacientes com toxoplasmose ocular aguda.

Na tabela 02 é mostrada a localidade dos pacientes que foram utilizados nos experimentos e a quantidade de camundongos C57Bl/6 inoculados com o PBMC de cada paciente. Nas demais figuras, os camundongos passarão a ser identificados com a sigla dos pacientes mostrado nessa tabela.

Tabela 02 – Identificação dos pacientes e sua localidade, e o número de camundongos infectados para cada paciente.

Paciente	Localidade	Quantidade B6
TC	Erechim	2
RS	Erechim	2
JMC	São Paulo	2
CH	Erechim	3
MB	Erechim	2
SK	Erechim	2
APF	Erechim	2
ES	Erechim	2
LAN	São Paulo	3
AGO	São Paulo	3
SD	Erechim	2 B6 IFN KO
CZ	Erechim	2 B6 IFN KO

Abreviações: B6: camundongo C57Bl/6;

B6 IFN KO: camundongo C57Bl/6 knock-out para IFN- γ .

Como controle positivo da reação de nested PCR (NT PCR) utilizou-se o DNA extraído de taquizoítas da cepa tipo I (RH), DNA extraído do sangue dos camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) e tipo II (ME49), DNA extraído do cérebro dos camundongos infectados com a cepa tipo II (ME49). Para comprovar que os primers utilizados amplificavam apenas material genético de *T. gondii* foi utilizado o DNA extraído do sangue e do cérebro do animal não infectado. Na figura 01 se apresenta o produto amplificado por Nested de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene B1 do *T. gondii*, produto amplificado contendo cerca de 530 pares de bases.

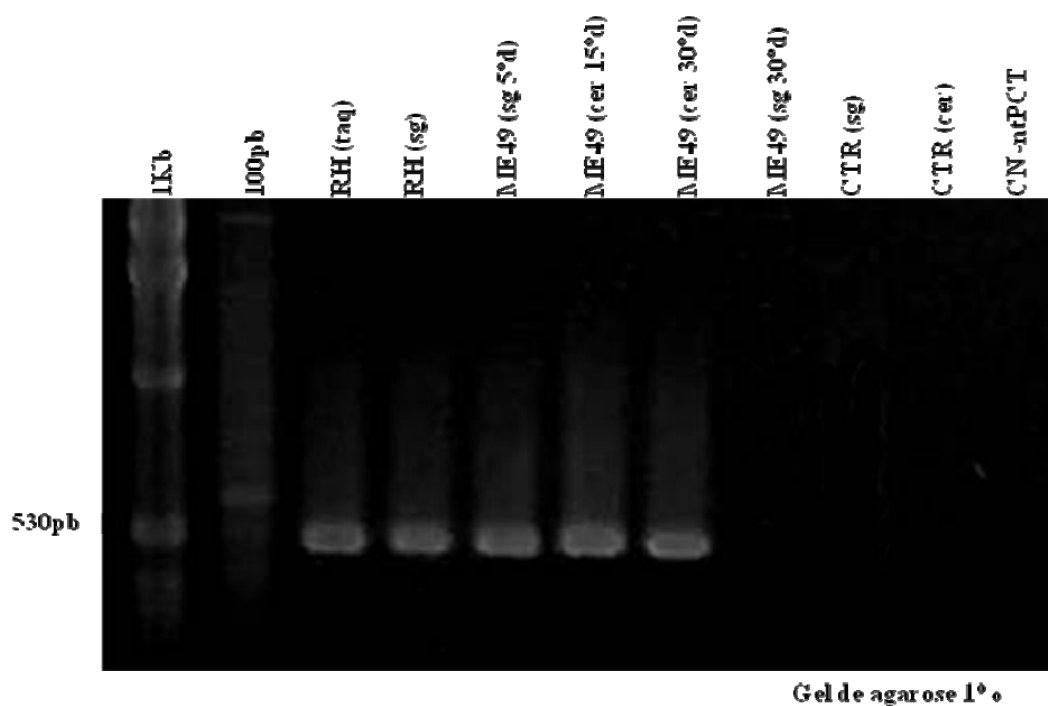


Figura 01 – Produtos de amplificação da reação de nested PCR utilizando primers para gene B1 de *T. gondii*. Os produtos são oriundos do DNA extraído de taquizoítas da cepa tipo I: RH (taq), de DNA extraído do sangue de camundongos infectados com cepas do tipo I: RH (sg) e do tipo II em dois tempos de infecção (5° dia e 30° dia): ME49 (sg 5°d); ME49 (sg 30°d) e de DNA extraído do cérebro dos camundongos infectados com a cepa tipo II em dois tempos de infecção (15° dia e 30° dia): ME49 (cer 15°d); ME49 (cer 30°d). Também foi extraído o DNA do sangue e do cérebro de camundongos não infectados: CTR (sg) e CTR (cer). O CN representa o controle negativo da reação. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Na figura 02 é possível observar que nenhum DNA extraído a partir do sangue dos camundongos inoculados com o PBMC dos pacientes infectados com *T. gondii* foi amplificado pelo primers do gene B1, indicando que esses camundongos não foram infectados por *T. gondii*. Não foi possível extrair o DNA do sangue dos camundongos ES, RS e TC.

O DNA extraído a partir do sangue do animal infectado com a cepa tipo II (ME49) foi realizado no 5º dia de infecção. Quando realizado o nested PCR do DNA extraído a partir do sangue do animal no 30º dia de infecção não houve amplificação do produto de *T. gondii*.

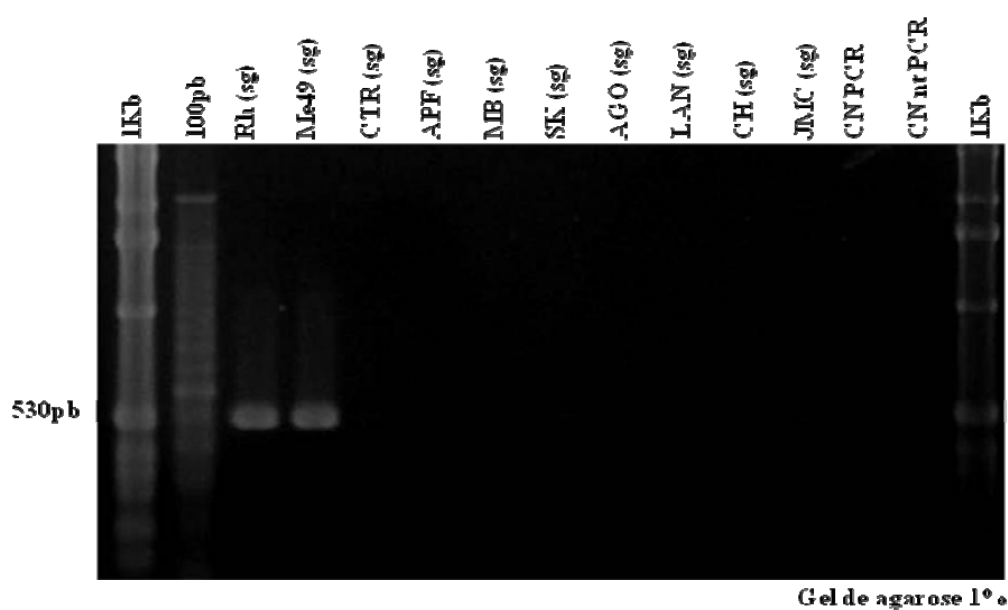


Figura 02 – Produtos de amplificação da reação de nested PCR utilizando primers para gene B1 de DNA extraído a partir do sangue dos camundongos. Os DNAs foram extraídos de sangue retirado por punção cardíaca de camundongos infectados com a cepa tipo I: RH (sg); com a cepa tipo II: ME49 (sg); de camundongo não infectado: CTR (sg); e de camundongos inoculados com PBMC dos pacientes, esses já citados na tabela 01. O CN representa o controle negativo da 1ª e 2ª reação. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Para comprovar se realmente os camundongos não estavam infectados, ou se não havia extraído o DNA do parasita a partir do sangue dos camundongos, foi realizado o nested PCR utilizando o DNA extraído do cérebro desses camundongos (figura 03), e mais uma vez confirmou-se que esses camundongos não estavam infectados

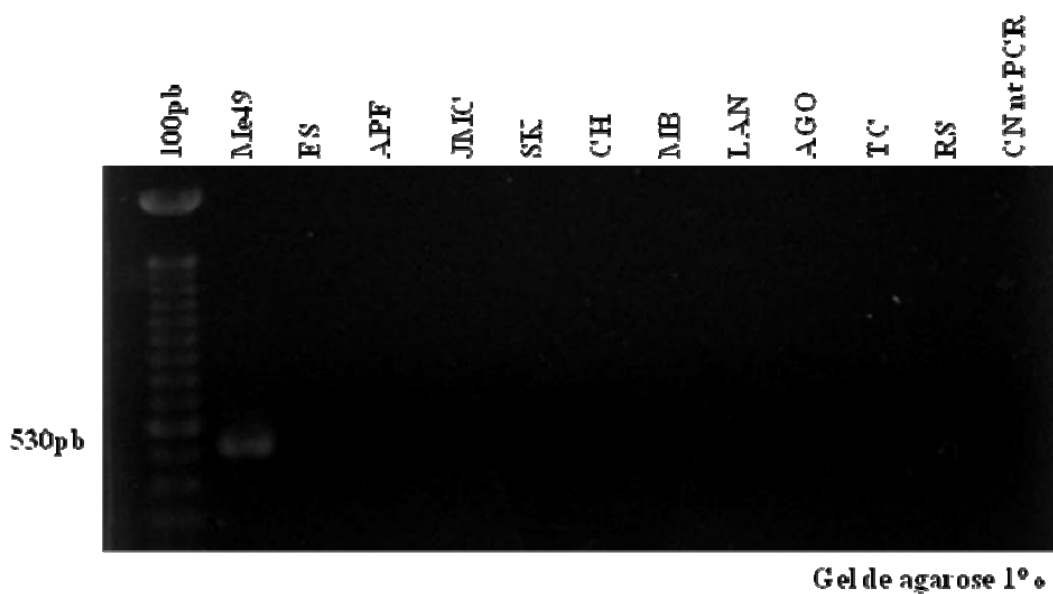


Figura 03 – Produtos de amplificação da reação de nested PCR utilizando primers para gene B1 de DNA extraído a partir do cérebro dos camundongos. Como controle positivo da reação foi utilizado o DNA extraído de camundongo no 30º dia de infecção pela cepa tipo II de *T. gondii*: ME49. Os demais DNAs foram extraídos do cérebro dos camundongos inoculados com PBMC de pacientes infectados com *T. gondii* (já citados na tabela 01). O CN representa o controle negativo da 2ª reação. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.3 Avaliação da fenotipagem de células dendríticas de baço de camundongos

Para investigação da resposta do sistema imune do hospedeiro contra o parasita *T. gondii*, bem como a evolução e o resultado da infecção por diferentes cepas desse parasita, avaliou-se a expressão de certas moléculas de superfície em DCs de baço de camundongos infectados com as cepas tipo I (RH), tipo II (ME49), e tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii*.

Para tal fenotipou-se as DCs esplênicas de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo I (RH) e a tipo BrI (TgCat Br71) em dois períodos: 3º e 5º dia após-infecção com 1×10^4 taquizoítas e as células de camundongos infectadas com a cepa tipo II (ME49) em quatro tempos de infecção: 3, 5, 15 e 30 dias pós- infecção com 10 cistos injetados intraperitoneal.

Verificou-se a expressão de CD40, CD80, CD86 e MHC classe II em células dendríticas CD11c⁺. Na figura 05 está representado a expressão da molécula de superfície CD40 em DCs CD11c⁺.

Na figura 04A se observa um aumento sem significância estatística no 5º dia de infecção pela cepa tipo II (ME49) de *T. gondii* em relação a porcentagem de DC CD11c⁺ CD40⁺ em camundongos controle negativo (não infectados). Porém, com a evolução da infecção ocorre uma diminuição significativa na porcentagem de células expressando a molécula CD40 nos camundongos no 15º e 30º dia de infecção em relação ao grupo de camundongos no 3º e 5º dia de infecção ($p < 0,001$) e aos animais controle ($p < 0,001$).

Em relação aos camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) (figura 04B) nota-se um pequeno aumento na porcentagem de DC CD11c⁺ CD40⁺ no 3º dia de infecção em relação aos camundongos controle negativo ($p < 0,01$) e uma grande diminuição dessas células nos animais do 5º dia em relação aos animais no 3º dia de infecção ($p < 0,001$) e aos camundongos controles ($p < 0,001$).

Na figura 04C é possível observar que a cepa tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii* gerou um pequeno aumento na porcentagem de células CD11c⁺ CD40⁺ no 3º dia de infecção em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), sendo que no 5º dia pós-infecção esta porcentagem de células aumenta ainda mais atingindo significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

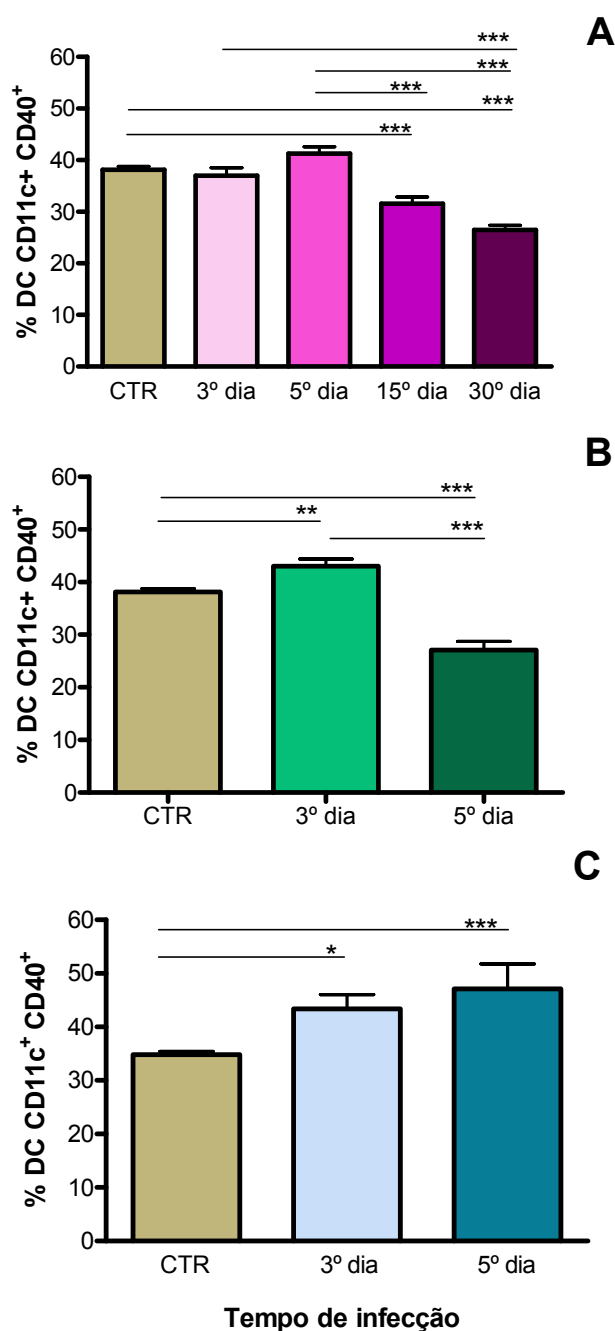


Figura 04 – Porcentagem de células dendríticas CD11c⁺ CD40⁺ de baço. Em A está representado a porcentagem dessas células no grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) em quatro períodos de infecção e no grupo de animais controle negativo (CTR). O gráfico B e C representam a quantidade de células dendríticas CD11c⁺ CD40⁺ em camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) e a tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii* e o grupo controle negativo respectivamente. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Quando comparada a porcentagem de DC CD11c⁺ expressando a molécula de superfície CD40 entre os três grupos de animais infectados e o grupo controle (figura 05), observa-se que há uma grande diferença na expressão dessa molécula no 5º dia de infecção entre o grupo infectado com a cepa RH em relação aos grupo infectados com a cepa ME49 e TgCatBr71 ($p < 0,001$), sendo que no grupo RH ocorreu uma expressiva diminuição na porcentagem de células expressando essa molécula do 3º para o 5º dia, sendo que nos dois outros grupos ocorreu aumento na porcentagem de DC CD11c⁺ CD40⁺. No entanto, a redução na porcentagem de CD40 vista no 5º dia de infecção do grupo RH ocorreu no grupo de camundongos infectados pela cepa ME49 apenas a partir do 15º dia de infecção, se equiparando ao nível observado no grupo RH após trinta dias de infecção.

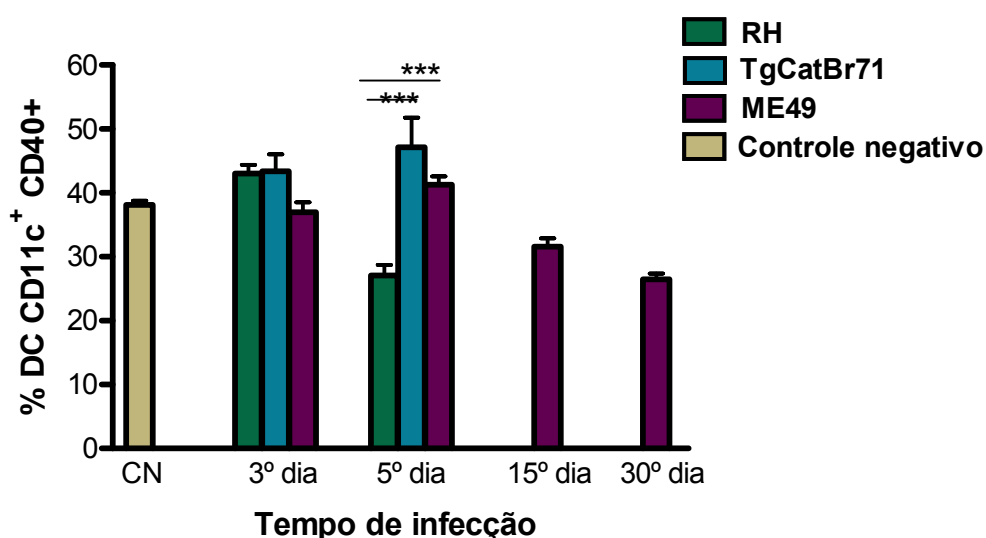


Figura 05 – Comparação entre a porcentagem de células dendríticas CD11c⁺ CD40⁺ de baço nos grupos analisados. Para cada tempo de infecção com as cepas tipo I (RH), tipo BrI (TgCatBr71) e tipo II (ME49) foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

A análise das DC CD11c⁺ expressando a molécula de superfície CD80 (figura 06) mostrou que houve um aumento significativo na porcentagem dessas células nos grupos de animais infectados em relação ao grupo controle, no entanto, nos grupos de camundongos infectados pela cepa tipo I (RH) e pela cepa tipo BrI (TgCatBr71), o pico na expressão ocorreu no 5º dia (figura 06B e 06C), enquanto no grupo infectado pela cepa tipo II (ME49) esse pico ocorreu no 15º dia após-infecção ($p < 0,001$) (figura 06A), permanecendo elevada até o 30º dia em relação ao início da infecção (3º dia: $p < 0,001$; 5º dia: $p < 0,01$) e ao grupo controle ($p < 0,001$).

No grupo RH (figura 06B) e no grupo TgCatBr71 (figura 06C) logo no 3º dia pós-infecção a porcentagem de células expressando a molécula CD80 já estava elevada em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente). Em relação ao 5º dia, houve aumento significativo na porcentagem de DC CD11c⁺ CD80⁺ no grupo RH quando comparado ao 3º dia de infecção ($p < 0,001$) e aos camundongos controle ($p < 0,001$), o mesmo não ocorreu no grupo de camundongos infectados pela cepa TgCatBr71, que permaneceu com a porcentagem de células expressando CD80 no 5º dia semelhante ao 3º pós-infecção.

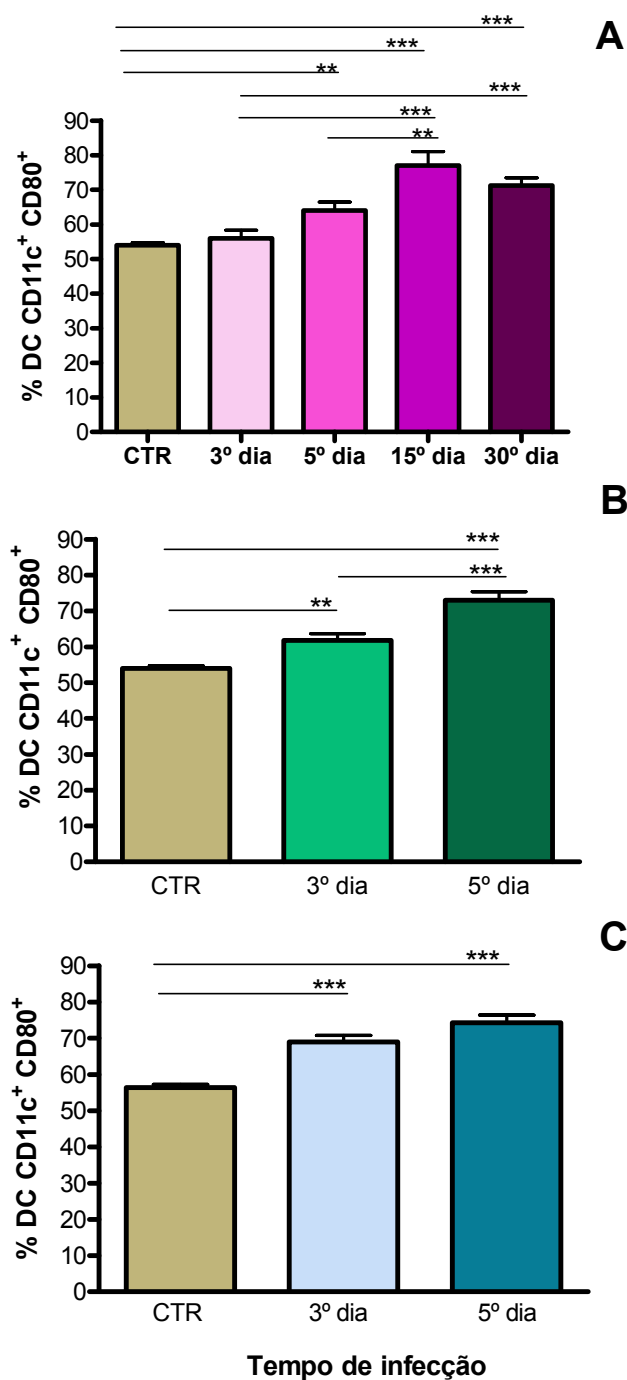


Figura 06 – Porcentagem de células dendríticas CD11c⁺ CD80⁺ de baço .O gráfico A representa a porcentagem de DC expressando CD80 no grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) em quatro fases da infecção e no grupo de animais controle negativo (CTR). A figura B e C mostra a quantidade de células dendríticas CD11c⁺ CD80⁺ em camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) e tipo BrI (TgCatBr71) em duas fases de infecção por *T. gondii* e o grupo controle negativo. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p,0,001).

Na figura 07 é apresentado o gráfico da porcentagem de expressão da molécula CD80 nos grupos estudados, no qual se compara a variação na porcentagem de DC CD11c⁺ CD80⁺ com a evolução da doença causada pelas cepas RH, TgCatBr71 e ME49. Neste gráfico fica visível que houve um aumento gradativo de células expressando CD80 nas DC CD11c⁺ nos grupos analisados, podendo-se comparar o aumento ocorrido no 15º dia do grupo ME49, com o aumento observado após cinco dias de infecção pela cepa RH e TgCatBR71.

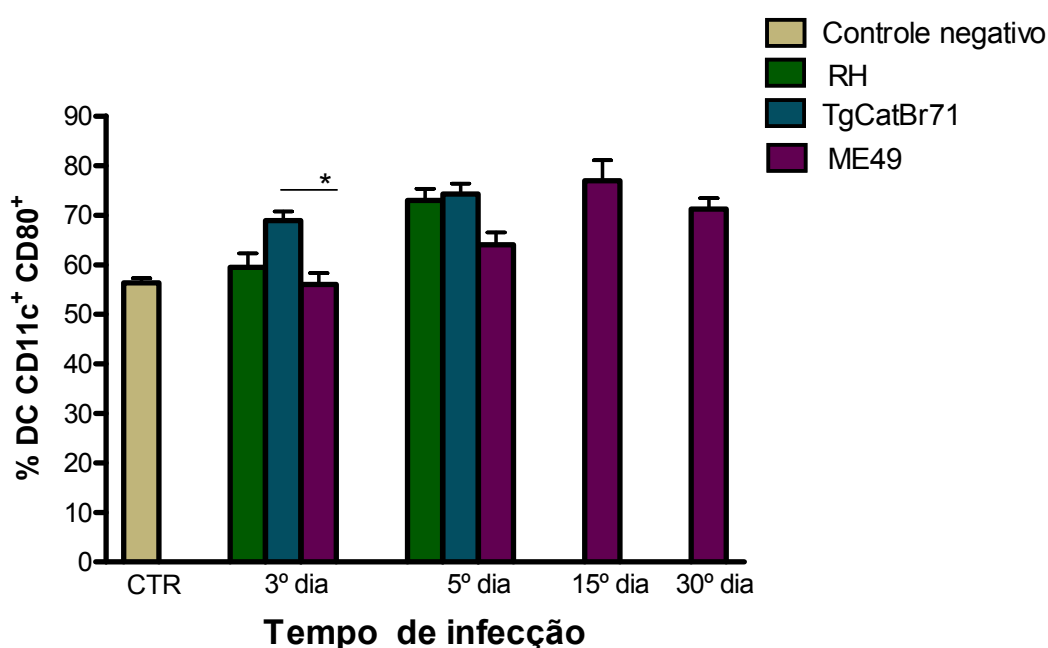


Figura 07 – Comparação entre a porcentagem de células dendríticas splênicas CD11c⁺ CD80⁺ nos respectivos tempos de infecção por cepas de *T. gondii*. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas (ME49) foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Avaliou-se em seguida a porcentagem de células DC CD11c⁺ expressando a molécula CD86 nestes mesmos grupos já citados. No grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) (figura 08A) não houve diferenças estatísticas na expressão das DC CD11c⁺ CD86⁺ com a evolução da doença e nem quando comparado ao grupo de animais controle negativo.

No grupo de animais infectados com a cepa tipo I (RH) (figura 08B) houve um aumento significativo na expressão de CD86 nas DC CD11c⁺ em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$), sendo que após cinco dias de infecção por *T. gondii* houve uma substancial diminuição na expressão em relação ao 3º dia ($p < 0,01$), aproximando-se do nível de expressão de CD86 nas DC CD11c⁺ do grupo controle.

A porcentagem de células CD11c⁺ expressando CD86 no grupo de animais infectados com a cepa TgCatBr71 (Figura 08C) foi similar ao visto no grupo de animais infectados com a cepa RH, havendo aumento com significância de $p < 0,01$ no 3º dia de infecção em relação ao grupo controle, sendo que no 5º dia a porcentagem de células expressando CD11c⁺ CD86⁺ diminuiu a níveis mais baixos ao do grupo controle se comparados o 3º e 5º dia de infecção ($p < 0,001$).

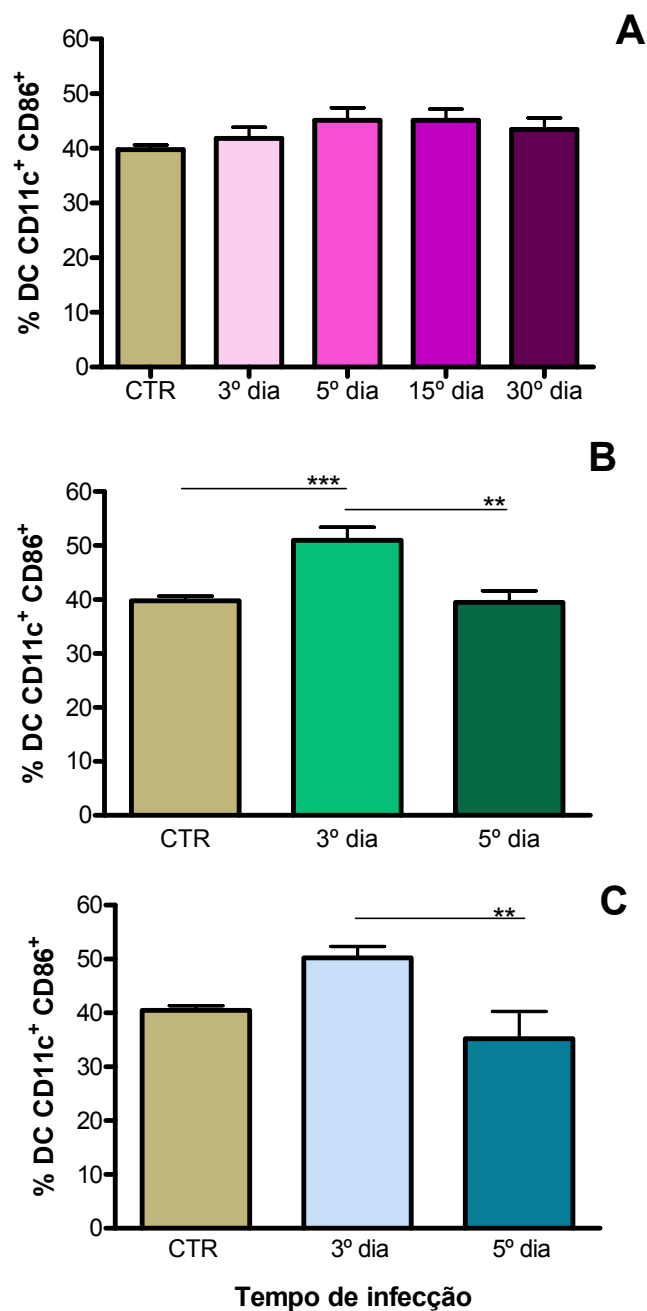


Figura 08 – Porcentagem de células dendríticas CD11c⁺ CD86⁺ de baço. O gráfico A representa a porcentagem de DC expressando CD86 no grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) em quatro fases da infecção e no grupo de animais controle negativo (CTR). No gráfico B e C está sendo mostrado a quantidade de células dendríticas CD11c⁺ CD86⁺ em camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) e a tipo BrI (TgCatBr71) respectivamente, em duas fases de infecção por *T. gondii* e o grupo controle negativo. Para cada tempo de infecção com as diferentes foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Na figura 09 compara-se a expressão da molécula de superfície CD86 entre os grupos infectados pelas cepas: tipo I (RH), tipo BrI (TgCatBr71) e tipo II (ME49). Observa-se que o grupo ME49 teve um discreto aumento na porcentagem de células expressando essa molécula, porém nada relevante significativamente. Comportando-se de maneira diferente, o grupo RH e TgCatBr71 mostraram ligeiro aumento no 3º dia pós-infecção com queda na porcentagem de DC CD11c⁺ expressando CD86. no 5º dia de infecção.

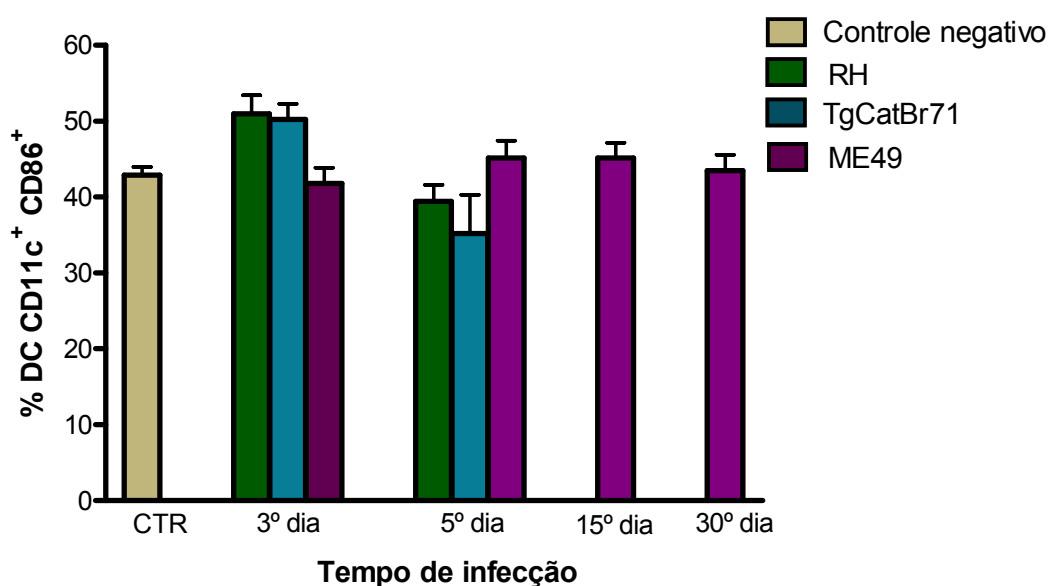


Figura 09 – Comparação entre a porcentagem de células dendríticas CD11c⁺ CD86⁺ esplênicas nos respectivos tempos de infecção por cepas de *T. gondii*. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p,0,001)

Por último avaliou-se a expressão da molécula de superfície MHC classe II em células dendríticas CD11c⁺ nos camundongos infectados com as diferentes cepas de *T. gondii*, comparando cada grupo separadamente com os animais do grupo controle negativo.

Observou-se que a porcentagem de células DC CD11c⁺ MHC II⁺ no grupo ME49 não variou muito em comparação com o grupo controle, havendo somente um leve aumento no subgrupo de animais após quinze dias de infecção pela cepa tipo II em relação ao grupo de animais não infectados ($p < 0,01$) (Figura 10A).

No grupo de animais infectados com a cepa RH (Figura 10B) houve significativo aumento de DCs expressando MHC classe II no 5º dia após-infecção por esta cepa em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$).

Na figura 10C nota-se que houve aumento na porcentagem de DCs CD11c⁺ MHC II⁺ no grupo de camundongos no 3º dia de infecção pela cepa TgCatBr71 em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), sendo mantido esse aumento após cinco dias de infecção.

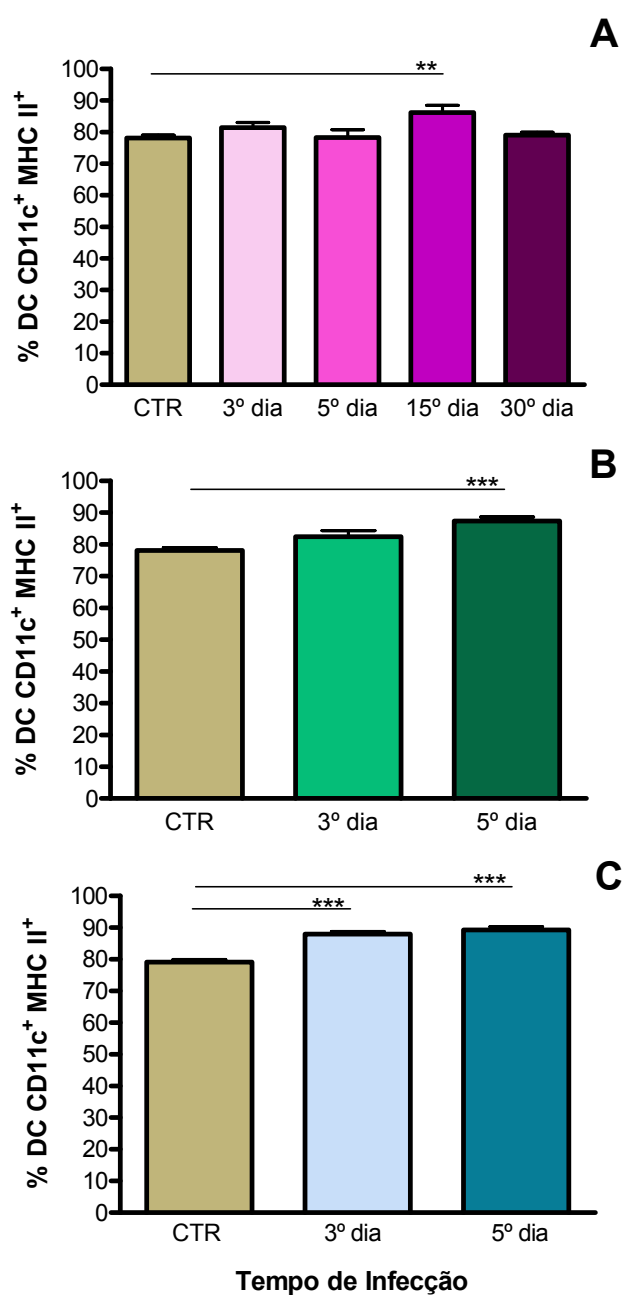


Figura 10 – Porcentagem de células dendríticas CD11c⁺ MHC II⁺ de baço. O gráfico A representa a porcentagem de DC expressando MHC II no grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) em quatro fases da infecção e no grupo de animais controle negativo (CTR). No gráfico B e C está sendo mostrado a quantidade de células dendríticas CD11c⁺ MHC II⁺ em camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) e tipo BrI (TgCatBr71) respectivamente, em duas fases de infecção por *T. gondii* e o grupo controle negativo. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p,0,001).

A figura 11 apresenta a porcentagem de DCs $CD11c^+ MHC II^+$ nos grupos de camundongos analisados. Neste gráfico é possível observar a pouca variação apresentada entre os grupos e nos diferentes tempos de infecção, sendo notável apenas o aumento na expressão de MHC classe II no 3º e 5º dia do grupo infectado com a cepa tipo BrI (TgCatBr71) e no 5º dia pelo grupo infectado com a cepa tipo I (RH), que é semelhante ao aumento visto no 15º dia do grupo infectado pela cepa tipo II (ME49).

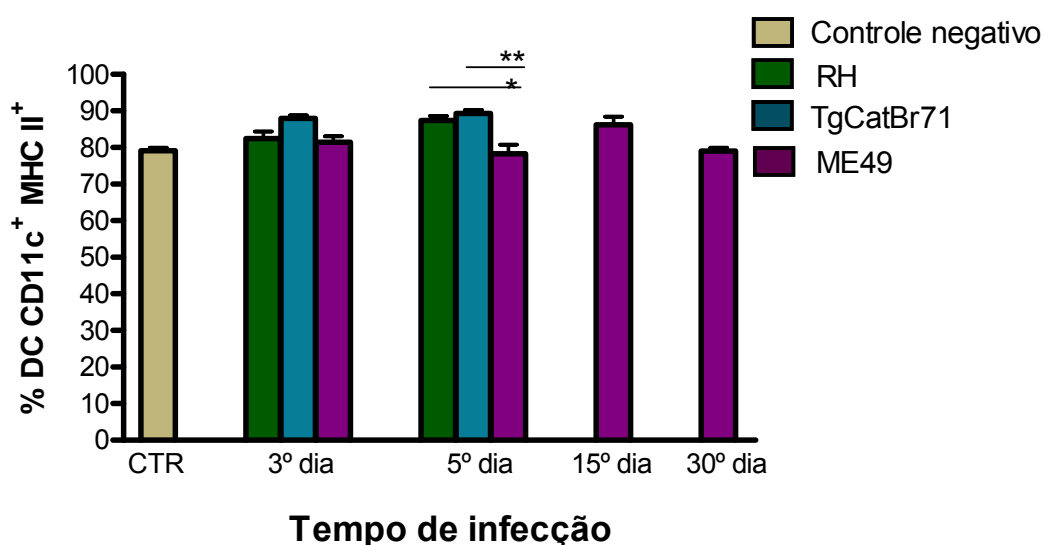


Figura 11 – Comparação entre a porcentagem de células dendríticas $CD11c^+ MHC II^+$ esplênicas nos respectivos tempos de infecção por cepas de *T. gondii*. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Foi avaliado também a alteração na porcentagem de células dendríticas CD11c⁺ entre os grupos analisados e com o decorrer da infecção por *T. gondii*. Apesar de o número de DC CD11c⁺ esplênicas recuperada por este protocolo ser baixo (descrito em Material & Métodos), foi possível observar diferenças consideráveis na quantidade dessas células entre os grupos e subgrupos analisados. Para tal análise foi utilizado o resultado referente a dupla marcação feita nas células com o anticorpo anti-CD40 FITC e o anticorpo anti-CD11c PE. Porém, analisando a porcentagem de DC CD11c⁺ com as outras marcações o resultado foi bastante semelhante ao apresentado na figura 12.

Na figura 12A pode-se observar que nos camundongos infectados com a cepa tipo II (ME49) a porcentagem de DC CD11c⁺ duplicou do 3º dia ($\bar{X} = 6,12$) para o 5º dia de infecção ($\bar{X} = 12,11$) ($p < 0,001$), havendo uma queda significativa do 5º para o 15º dia de infecção ($\bar{X} = 7,86$) ($p < 0,01$), com um novo aumento nos dias decorrentes, observado no 30º dia de infecção ($\bar{X} = 14,46$) ($p < 0,001$). Analisando o número total de células CD11c⁺ (figura 19A – anexo 02) verificou-se que o aumento na porcentagem dessas células observado no 15º dia de infecção condiz com o aumento no número dessas células no baço, no entanto, o aumento na porcentagem dessas células no 30º dia não é acompanhado do aumento no número absoluto deste tipo celular no baço (figura 19A – anexo 02).

No grupo de animais infectados com a cepa tipo I (RH) (figura 12B) houve um aumento com significância de $p < 0,001$ no 3º dia de infecção em relação ao grupo de animais não infectados, sendo observado um aumento no número total de células CD11c⁺ nesse mesmo período (figura 19B – anexo 02). A porcentagem dessas células no baço permaneceu elevada até o 5º dia em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$), no entanto, em relação ao número total de DC CD11c⁺ houve queda da população nesse período quando comparado ao grupo no 3º dia de infecção ($p < 0,01$).

Em relação ao grupo de animais infectados com a cepa tipo BrI (TgCatBr71) (figura 12C) houve um aumento pequeno no 3º dia pós-infecção quando comparado ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), sendo observado aumento significativo na porcentagem de DC CD11c⁺ no 5º dia de infecção em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$), sendo que em relação ao número absoluto dessa células não houve diferenças em relação ao grupo controle (Figura 19C – anexo 02).

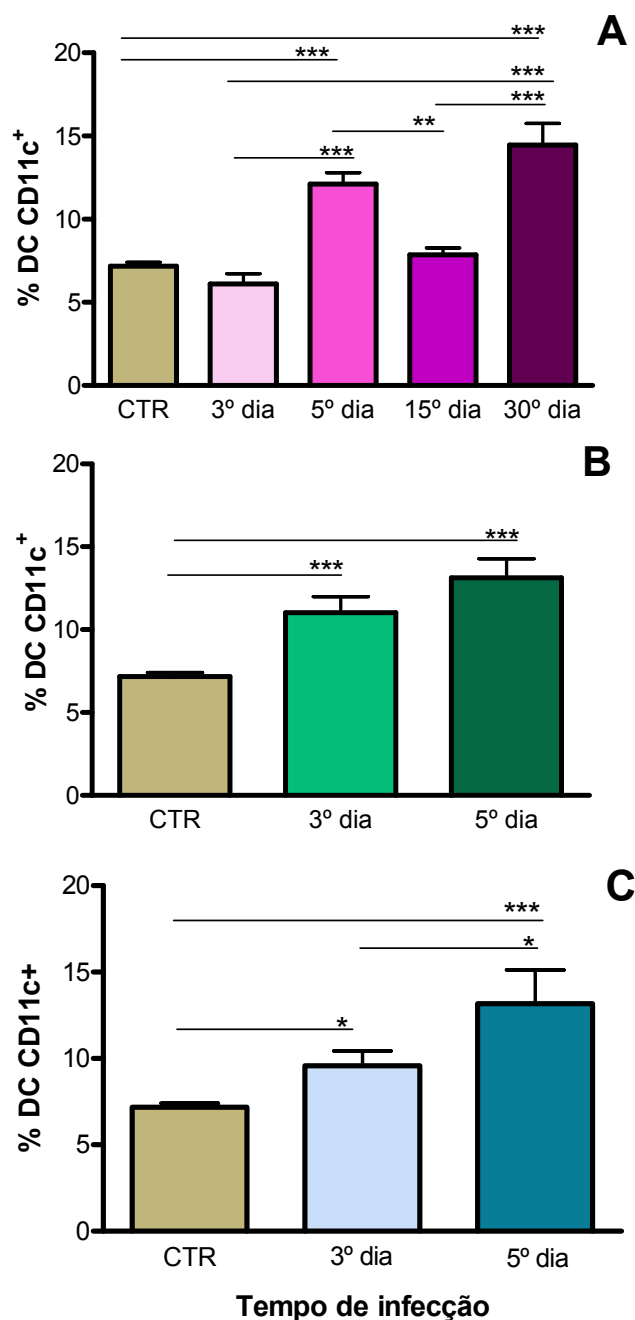


Figura 12 – Porcentagem de células dendríticas CD11c⁺ esplênicas. O gráfico A representa a porcentagem de DC CD11c⁺ no grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) em quatro fases da infecção e no grupo de animais controle negativo (CTR). No gráfico B e C está sendo mostrado a quantidade de células dendríticas CD11c⁺ em camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) e tipo BrI (TgCatBr71) respectivamente, em duas fases de infecção por *T. gondii* e o grupo controle negativo. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Na figura 13 está representada a variação na porcentagem de DCs CD11c⁺ nos grupos estudados apresentado-os em relação a evolução da doença causada por cada tipo de cepa de *T. gondii*. Nesse gráfico fica evidente a diferença na porcentagem de DC encontrado nos animais infectados pelas cepas RH e TgCatBR71, no qual logo no 3º dia já ocorreu um aumento dessas células, que alcançaram seu pico no 5º dia de infecção por estas cepas de *T. gondii*.

Na infecção causada pela cepa tipo II (ME49) há uma variação significativa na porcentagem de DC CD11c⁺ em relação ao tempo de infecção, permanecendo baixa a porcentagem destas no 3º e 15º dia pós-infecção e aumentando nos outros dois períodos analisado nesse grupo, alcançando o pico no 30º dia de infecção.

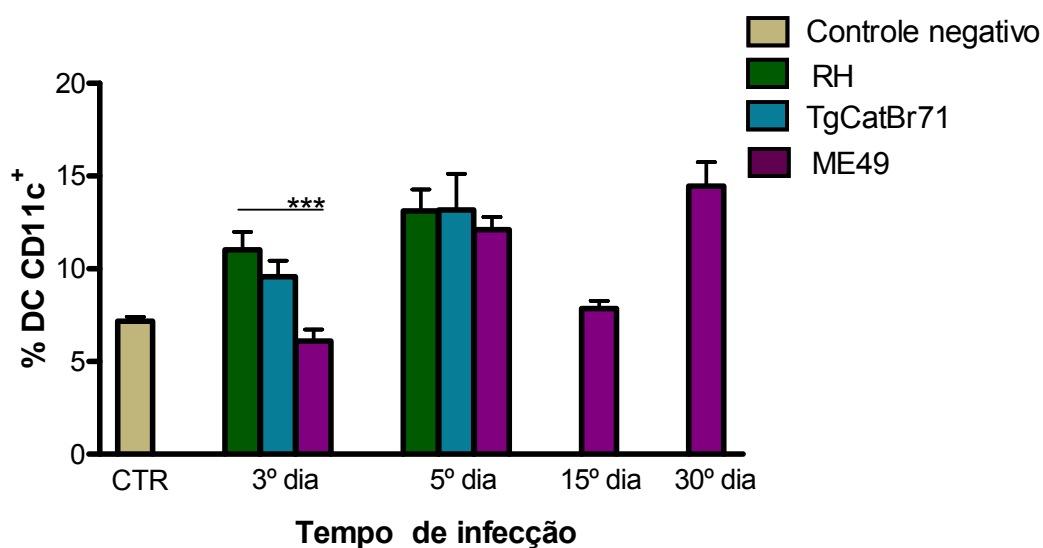


Figura 13 – Comparação entre a porcentagem de células dendríticas esplênicas CD11c⁺ nos respectivos tempos de infecção por cepas de *T. gondii*. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

4.4 Correlação entre a porcentagem de célula CD4 e células CD8 e a infecção por diferentes cepas de T. gondii

Fenotipou-se também as células esplênicas com anticorpo anti-CD4 e anti-CD8 para observar e comparar a variação na porcentagem de células CD4⁺ e células CD8⁺ nos grupos de animais infectados pelas cepas: tipo I (RH), tipo II (ME49) e tipo BrI (TgCatBr71) e no grupo de animais controle negativo, bem como essa variação no decorrer da infecção, observando o 3º e 5º dia da infecção pela cepa RH e TgCatBr7 e o 3º, 5º, 15º e 30º dia de infecção pela cepa ME49.

Na figura 14 foi possível observar que no grupo de animais infectados pela cepa tipo II (ME49), a porcentagem de células CD4⁺ (figura 14A) diminuiu com o passar dos dias de infecção, havendo uma redução brusca no 15º dia de infecção ($\bar{X} = 10,28$), com uma retomada no 30º dia ao nível observado no grupo de animais controle negativo ($\bar{X} = 21,78$). Em relação a porcentagem de células CD8⁺ (figura 14B) notou-se uma diminuição gradual na quantidade de células CD8⁺, alcançando o nível mais baixo no 15º dia de infecção, sendo semelhante ao observado para as células CD4⁺. Porém, após 30 dias de infecção há uma grande elevação na porcentagem de células CD8⁺, havendo uma inversão na proporção de células CD4/CD8 em relação a proporção observada no grupo de animais não infectados. Ao analisar os gráficos com os números totais de células CD4⁺ e CD8⁺ é possível observar que a diminuição na porcentagem desses tipos celulares no 15º dia de infecção pela cepa ME49 é acompanhada por diminuição no número total dessas células no baço (figura 20A e 20B – anexo 03). No entanto, a magnitude do aumento observado na porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ não é observado em relação ao número absoluto desses tipos celulares no baço, havendo um pequeno aumento no número dessas células quando comparado ao 15º dia de infecção mas sem significância estatística.

No grupo de animais infectados pela cepa tipo I (RH) houve também uma redução de quase 50% na porcentagem de células CD4⁺ (figura 14C) do 3º ($\bar{X} = 21,40$) para o 5º dia após-infecção ($\bar{X} = 11,67$), sendo tal redução observada na figura 20C (Anexo 03), onde se analisou o número total de células CD4⁺, com significância de $p < 0,001$ quando comparado o 5º dia com o 3º dia de infecção deste grupo e ao grupo controle. Porém, em relação as células CD8⁺ (figura 14D) não houve quase nenhuma variação entre os tempos de infecção pela cepa RH, havendo apenas uma mínima diferença entre o 3º dia do grupo de animais infectados com

o grupo de animais controle negativo ($p < 0,05$), no entanto houve diminuição no número total de células $CD8^+$ (figura 20D – anexo 02) no 5º dia de infecção em relação ao 3º dia ($p < 0,001$) e ao grupo controle ($p < 0,001$).

O grupo de animais infectados pela cepa tipo BrI (TgCatBR71) apresentou uma porcentagem menor de células $CD4^+$ no 3º ($p < 0,01$) e 5º dia de infecção ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle (figura 14E). Em relação a porcentagem de células $CD8^+$ de camundongos infectados pela cepa TgCatBR71 (figura 14F) houve uma ligeira diminuição no número dessas células a partir do 5º dia de infecção quando comparado ao 3º dia de infecção ($p < 0,001$) e ao grupo controle ($p < 0,001$). Ao analisar esses tipos celulares quanto ao número absoluto é possível notar que houve uma diminuição no número de células $CD4^+$ nos dois períodos estudados em relação ao grupo controle, no entanto, sem diferenças estatísticas (figura 20E – anexo 03). Em relação ao número absoluto de células $CD8^+$ (figura 20F – anexo 03) a diminuição na porcentagem dessa célula observada no 5º dia de infecção foi acompanhada de redução no número total neste mesmo período quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

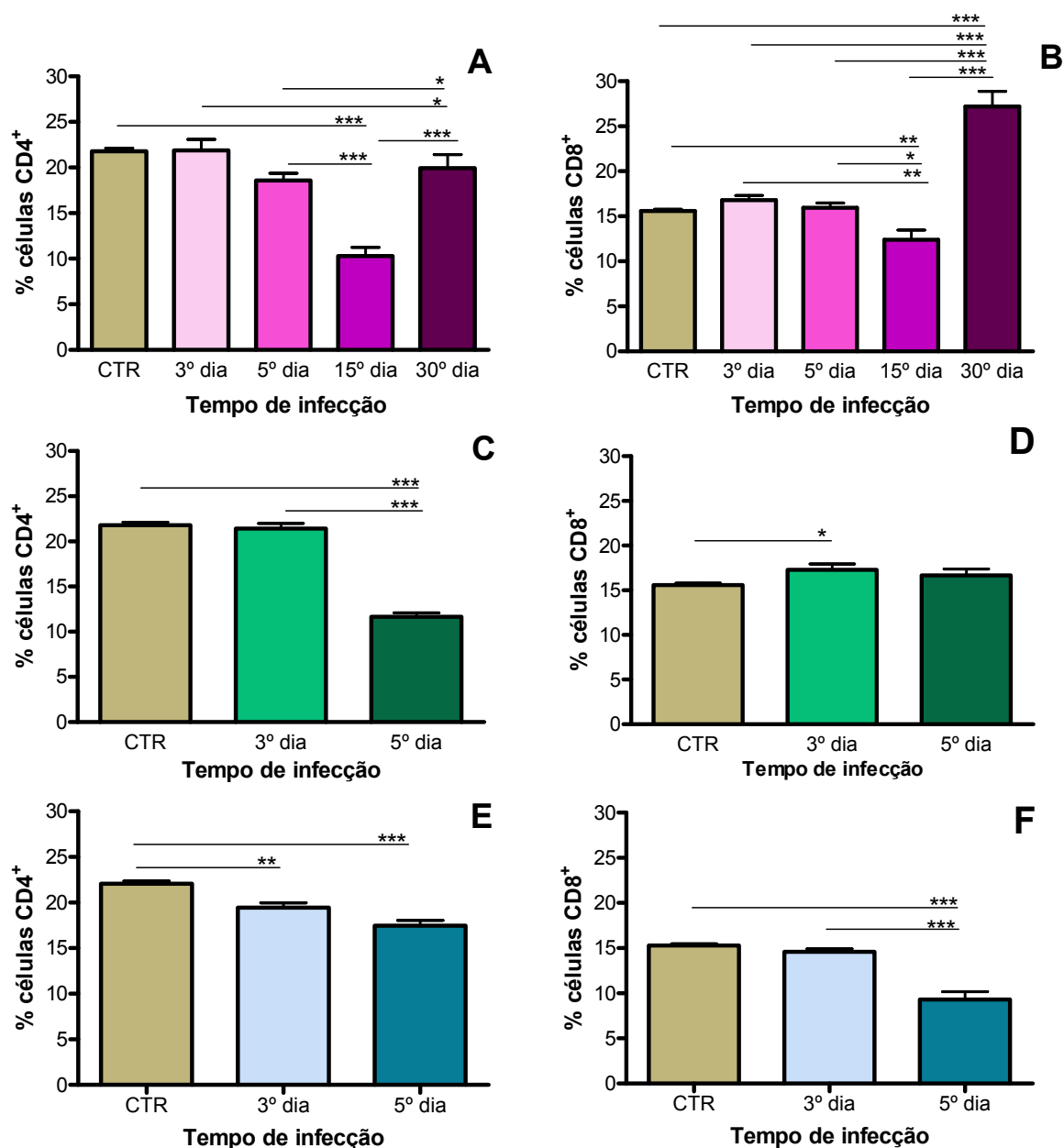


Figura 14 – Avaliação das populações de células CD4⁺ e CD8⁺ esplênicas. O gráfico A e B representam a porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ respectivamente no grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) em quatro fases da infecção e no grupo de animais controle negativo (CTR). O gráfico C e D mostram, respectivamente, a quantidade de células CD4⁺ e CD8⁺ em camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) em duas fases de infecção por *T. gondii* e o grupo controle negativo, bem como os gráficos E e F a porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ no grupo de animais infectados com a cepa tipo BrI (TgCatBr71). Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

Pode-se observar na figura 15 a modificação na porcentagem desses dois tipos celulares no decorrer da infecção. Nesse gráfico ficou evidente a inversão na porcentagem de células CD4⁺ e células CD8⁺ em relação ao grupo controle com a evolução da doença, sendo que no grupo infectado pela cepa tipo I (RH), a inversão ocorreu logo no 5º dia pós-infecção, com diminuição na quantidade de células CD4⁺ e manutenção das células CD8⁺. No grupo infectado pela cepa tipo II (ME49) essa inversão na porcentagem de células CD4⁺/CD8⁺ foi observada apenas no 15º dia pós-infecção. Junto da inversão ocorreu também a redução de ambos os tipos celulares (figura 20 – anexo03).

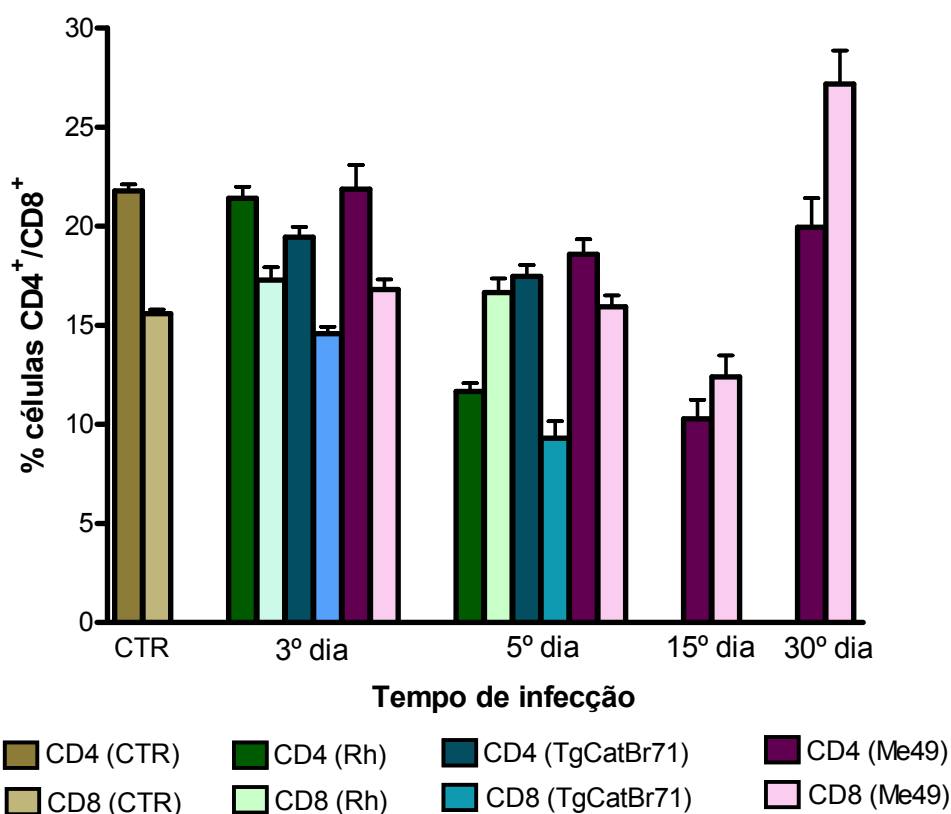


Figura 15 – Variação da porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ esplênicas nos diferentes tempos de infecção por diferentes cepas de *T. gondii*. O gráfico representa em forma de barra os valores médios da porcentagem de células CD4 e CD8 encontrada em cada tempo de infecção dos camundongos infectado pela cepa RH, TgCatBr71 e ME49. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas de *T. gondii* foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados da figura são dados pela média \pm desvio padrão.

4.5 Análise das citocinas produzida em camundongos infectados por diferentes cepas de *T. gondii*

Verificou-se a produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-12p40 e IFN- γ , e da anti-inflamatória, IL-10, nos camundongos infectados pela cepa tipo I (RH), tipo BrI (TgCatBR71) e tipo II (ME49) e foi observado como elas se comportam no desenvolvimento da doença, uma vez que é sabido que essas citocinas exercem influência na resistência a infecção por *T. gondii*.

A figura 16 representa a produção da citocina IL-12p40 nos quatro grupos analisados: grupo infectado pela cepa tipo I (RH); grupo infectado pela cepa tipo BrI (TgCatBr71); grupo infectado pela cepa tipo II (ME49); e grupo de camundongos controle negativo (não infectados).

A figura 16A apresenta a produção de IL-12p40 nas culturas estimuladas com STAg. Neste gráfico é possível observar que no grupo de camundongos infectados com a cepa RH houve uma leve redução na produção dessa citocina do 3º para o 5º dia de infecção ($p < 0,05$). No grupo de camundongos infectados pela cepa TgCatBr71 houve elevada produção de IL-12p40 logo no 3º dia de infecção quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$), permanecendo elevada a produção ainda no 5º dia da infecção por esta cepa quando comparado ao 5º dia de infecção pela cepa RH ($p < 0,001$).

Observou-se também que o perfil da produção de IL-12p40 nos camundongos infectados pela cepa tipo II (ME49) é bem diferente da observada no grupo RH e TgCatBr71. No grupo ME49, logo no 3º dia pós-infecção houve um exacerbado aumento na produção de IL-12p40 tanto em relação ao 3º dia do grupo RH ($p < 0,001$) e ao grupo TgCatBr71 ($p < 0,01$), como em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). No 5º e 15º dia a elevada produção dessa citocina se manteve, havendo mínimas variações nesses períodos. No entanto, no 30º dia após a infecção pela cepa II (ME49) a produção de IL-12p40 diminuiu, equiparando-se ao nível observado no grupo controle negativo.

Na figura 16B está representada a produção de IL-12p40 nas culturas de células dos três grupos analisados na figura 16A, no entanto, em outra condição experimental, uma vez que essas culturas foram estimuladas com ConA, substância que estimula a proliferação de células T, representando portanto, o nosso controle positivo do experimento para comparar à

síntese de IL-12p40 antígeno - específica em resposta a infecção por *T. gondii* (cultura estimulada com STAg). A figura 16C apresenta produção basal de IL-12p40 nas já citadas condições experimentais.

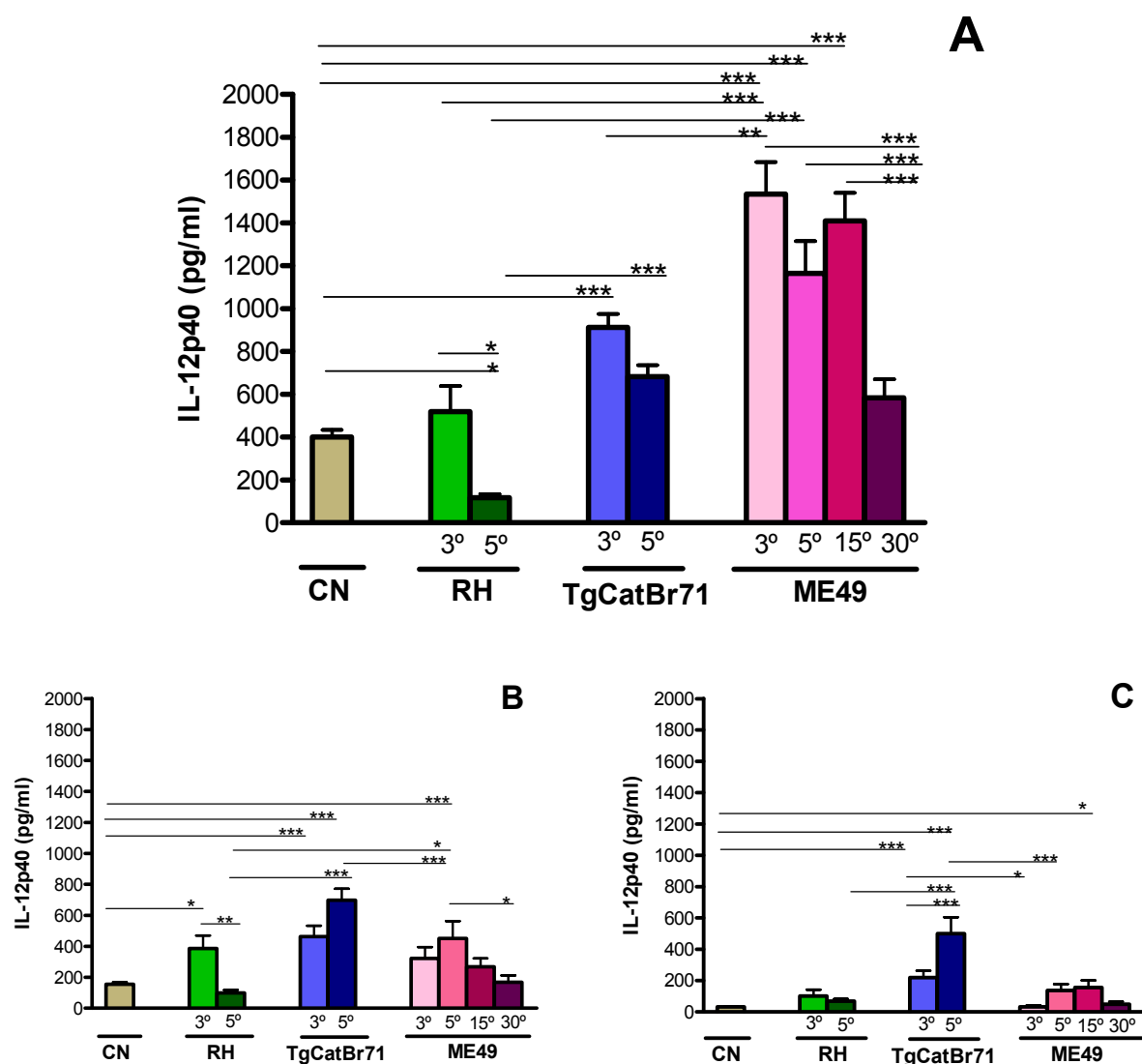


Figura 16 – Produção de IL-12p40 em camundongos infectados por diferentes cepas de *T. gondii* em determinados tempos da infecção. No gráfico A está representado a detecção por ELISA da citocina IL-12p40 em culturas de células esplênicas de camundongos infectados pela cepa RH, TgCatBr71 e ME49 nos seguintes dias pós-infecção: 3° e 5° dia para os grupos RH e TgCatBR71; e 3°, 5°, 15° e 30° dia pós-infecção para o grupo ME49, que foram estimuladas por 48 horas com 10µg/ml de STAg. Em B e C são apresentados os resultados da produção de IL-12p40 nas culturas de células dos grupos citados em A, porém estimulados com 2,5µg/ml de ConA (gráfico B) e sem estímulo (gráfico C). A quantificação da citocina foi efetuada pelo método de ELISA. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média ± desvio padrão. Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p,0,001).

Outra citocina pró-inflamatória quantificada nessas culturas de células de baço de camundongos submetido à infecção por cepas diferentes de *T. gondii* foi o IFN- γ . Além de observar se houve diferença na produção dessa citocina quando os camundongos são infectados por cepas diferentes, avaliou-se também a variação na síntese de IFN- γ durante a evolução da doença.

Na figura 17 foram apresentados os gráficos da quantificação por ELISA da citocina IFN- γ quando as culturas de células foram submetidas a diferentes estímulos. Na figura 17A as células foram estimuladas com 10 μ g/ml de STAg, em B (figura 17B) com 2,5 μ g/ml de ConA e em C (figura 17C) as células não receberam nenhum estímulo. Essas culturas ficaram sob essas condições por 72h, sendo após esse período feita a quantificação.

É bastante evidente o aumento na síntese de IFN- γ observado no 5º dia de infecção pela cepa RH em relação ao 3º dia deste grupo ($p < 0,001$), em relação ao 5º dia do grupo infectado com a cepa TgCatBr71 e ME49 ($p < 0,001$) e ao grupo controle negativo ($p < 0,001$) (figura 17A). Em relação ao grupo infectado pela cepa TgCatBr71 houve aumento significativo na produção de IFN- γ a partir do 5º dia de infecção quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$) e ao 3º dia de infecção por esta cepa ($p < 0,01$), no entanto, a produção desta citocina era bastante inferior ao produzido no mesmo período no grupo infectado pela cepa RH ($p < 0,001$)

No grupo de camundongos infectados por ME49 a produção de IFN- γ foi substancialmente elevada, no entanto, este aumento só foi visto a partir do 15º dia de infecção, havendo diferença estatística deste dia em relação aos outros períodos analisados ($p < 0,001$), bem como ao grupo controle ($p < 0,001$). No 30º dia pós-infecção ocorreu uma redução no nível de IFN- γ quantificado, porém este é ainda elevado em relação ao 3º e 5º dia e ao grupo controle (figura 17A).

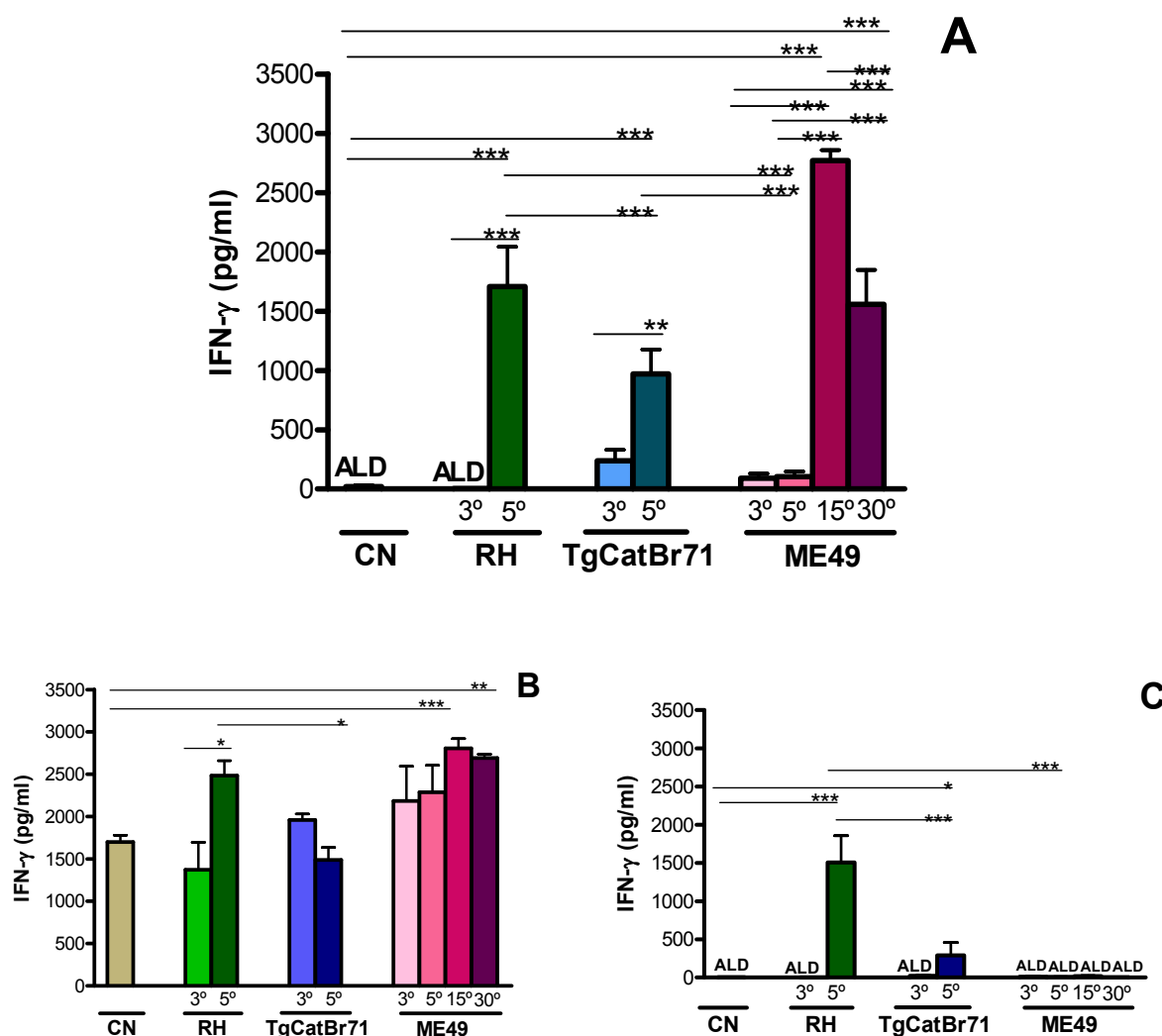


Figura 17 – Produção de IFN- γ em camundongos infectados por diferentes cepas de *T. gondii* em determinados tempos da infecção. No gráfico A está representado a detecção de IFN- γ em culturas de células esplênicas de camundongos infectados pela cepa RH, TgCatBr71 e ME49 nos seguintes dias pós-infecção: 3^o e 5^o dia para o grupo RH e TgCatBr71; e 3^o, 5^o, 15^o e 30^o dia pós-infecção para o grupo ME49, que foram estimuladas por 72 horas com 10 μ g/ml de STA. Em B e C são apresentados os resultados da produção de IFN- γ nas culturas de células dos grupos citados em A, estimuladas com 2,5 μ g/ml de ConA (gráfico B) e sem estímulo (gráfico C). A quantificação da citocina foi efetuada pelo método de ELISA. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média \pm desvio padrão. Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p,0,001). Abreviação: ALD: abaixo do limite de detecção.

Analisou-se também a citocina anti-inflamatória IL-10 sob as mesmas condições já especificadas na avaliação das citocinas IL-12p40 e IFN- γ . Resumidamente, a quantificação desta citocina foi feita após 72 horas que as culturas de células esplênicas de camundongos infectados com as cepas RH, TgCatBr71 e ME49 foram estimuladas com: 10 μ g/ml de STAg (figura 18A); 2,5 μ g/ml de ConA (figura 18B); e como controle negativo as culturas não receberam nenhum estímulo.(figura 18C).

Na figura 18A observou-se um aumento na síntese de IL-10 com o decorrer da doença, tanto no grupo infectado com a cepa tipo I (RH) quanto no grupo infectado com a cepa tipo II (ME49). No primeiro caso, ocorreu uma elevação leve na produção de IL-10 após 5 dias de infecção pela cepa RH em relação ao grupo de camundongos controle negativo ($p < 0,001$).

Em relação ao grupo de camundongos infectados pela cepa ME49 houve um acentuado aumento na síntese de IL-10 a partir do 15º dia de infecção, tanto em relação aos outros tempos de infecção por esta cepa ($p < 0,001$), quanto ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). No 30º dia de infecção ocorre uma diminuição no nível de IL-10 detectado, porém se comparado ao 3º ($p < 0,001$), ao 5º dia ($p < 0,01$) pós-infecção e ao grupo de camundongos não infectados ($p < 0,001$) há diferenças estatísticas significativas (figura 18A).

O grupo infectado pela cepa TgCatBr71 apresentou produção da citocina IL-10, porém essa produção foi bem semelhante ao visto no grupo controle, não havendo portanto diferenças estatísticas entre os grupos e nos tempos de infecção estudados.

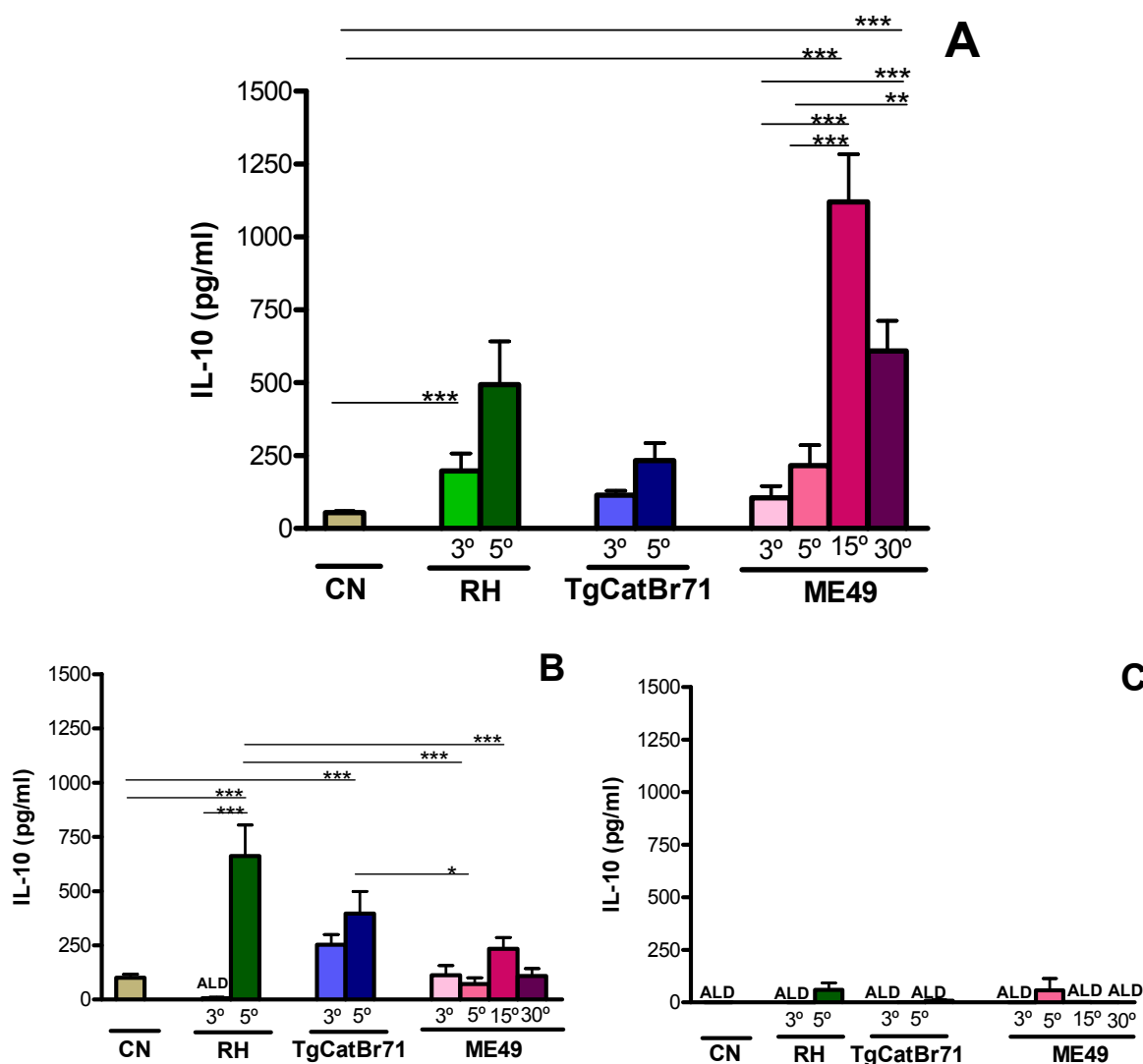


Figura 18 – Produção de IL-10 em camundongos infectados por diferentes cepas de *T. gondii* em determinados tempos de infecção. No gráfico A está representado a síntese de IL-10 em culturas de células esplênicas de camundongos infectados pela cepa RH, TgCatBr71 e ME49 nos seguintes dias pós-infecção: 3° e 5° dia para o grupo RH e TgCatBr71; e 3°, 5°, 15° e 30° dia pós-infecção para o grupo ME49, que foram estimuladas por 72 horas com 10 µg/ml de STA. Em B e C são apresentados os resultados da produção de IL-10 nas culturas de células dos grupos citados em A, estimuladas com 2,5 µg/ml de ConA (gráfico B) e sem estímulo (gráfico C). A quantificação da citocina foi efetuada pelo método de ELISA. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média ± desvio padrão. Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p,0,001). Abreviação: ALD: abaixo do limite de detecção.

5 Discussão

5 Discussão

O *T. gondii* até recentemente era considerado clonal com pequena variabilidade genética, sendo classificado em três linhagens baseado na análise de polimorfismos dos fragmentos de restrição de diferentes genes (HOWE & SIBLEY, 1995; SIBLEY *et al*, 2002). Tipicamente, 95% das linhagens isoladas na América do Norte e Europa pertencem a um dos três genótipos altamente clonais (HOWE & SIBLEY, 1995). No entanto, recentemente propõe-se que exista um alto grau de diversidade genética entre as linhagens encontradas em algumas áreas geográficas e possivelmente entre animais não-domésticos (AJZENBERG *et al*, 2004).

Recentes estudos indicam que cepas de *T. gondii* isoladas no Brasil são geneticamente e biologicamente diferentes das cepas isoladas nos Estados Unidos da América e Europa (DUBEY *et al.*, 2002, 2003a,b, 2006a; LEHMANN *et al.*, 2004, 2006). Esses estudos têm revelado que as cepas isoladas de animais ou humanos apresentam alta variabilidade genética. (AJZENBERG *et al*, 2004; LEHMANN *et al.*, 2004).

Nos trabalhos desenvolvidos por nosso grupo, avaliamos pelo método da sorotipagem (KONG *et al*, 2003) a presença de anticorpos em amostra de soro de pacientes de Erechim soropositivos para *T. gondii* para diferenciação entre as linhagens que infectam essa população, distinguindo a linhagem do tipo II das linhagens do tipo I e III do parasita. Com esses resultados mostramos que há um grande número de pacientes infectados que não respondem contra qualquer dos peptídeos e que a maioria deles apresentam a forma grave da doença ocular. Nossos dados também mostraram que uma parte dos pacientes infectados com a cepa tipo II apresenta a forma grave da toxoplasmose, porém sem desenvolvimento de lesão ocular, dados que contrastam com o que ocorre na Europa e Estados Unidos no qual a cepa tipo II é a linhagem responsável pela toxoplasmose ocular (HOWE *et al*, 1997; FUENTES *et al*, 2001; HONORÉ *et al*, 2000). Sendo assim, nossos resultados apontam para uma diversidade genética na cepa que infecta indivíduos de Erechim e outras partes do Brasil, sugerindo que existe uma cepa atípica responsável pela forma grave da toxoplasmose ocular nessa região do Brasil. Com isso, este trabalho objetiva o isolamento, em camundongos, dessas cepas que infectam essa região para que possamos caracterizá-las molecular e fenotipicamente e, desta forma, compreender de que forma o sistema imune do hospedeiro responde a diferentes linhagens do parasita, levando a diferentes graus de patologias.

Para confirmação da infecção dos camundongos supostamente infectados com *T. gondii* oriundo de pacientes infectados utilizamos ferramentas moleculares para detecção deste parasita. Muitos estudos diagnósticos têm se preocupado com desenvolvimento de técnicas baseadas em reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar DNA de *T. gondii* em diferentes amostras clínicas incluindo sangue, biópsia de cérebro e fluido cerebrospinal (CSF). (BURG *et al.*, 1989; NICOLL *et al.*, 1996)

Para detecção de *T. gondii*, a seqüência usada mais freqüentemente é o gene B1, identificado pela primeira vez por BURG e colaboradores (1989) apresentando 35 cópias no genoma. A função deste gene não é bem conhecida, porém sua alta especificidade está bem estabelecida.

Sendo assim, utilizamos este gene na tentativa de amplificar fragmentos do DNA de *T. gondii* no material extraído do sangue e do cérebro de camundongos inoculados com PBMC de pacientes com toxoplasmose ocular aguda. Na fase aguda da infecção encontra-se taquizoítas circulantes no sangue, sendo mais fácil conseguir isolar a cepa do parasita a partir de pacientes nesta fase da doença, muito embora já tenha sido detectado taquizoítas circulantes em pacientes na fase crônica da doença (NGUYEN *et al.*, 1996; KHAN *et al.*, 2006).

Na figura 01 mostramos que o gene B1 amplificou os fragmentos do DNA de *T. gondii* oriundos de DNA extraído do taquizoítas da cepa tipo I (RH), do sangue de camundongos infectados com as cepas tipo I e tipo II, e do cérebro de camundongos após quinze e trinta dias de infecção pela cepa tipo II (ME49), reforçando a especificidade e sensibilidade deste gene. Na fase crônica da doença pela cepa tipo II não foi amplificado o DNA do parasita extraído do sangue do camundongo no 30º dia de infecção.

No DNA extraído dos camundongos inoculados com o PBMC dos pacientes não foi amplificado fragmentos do gene B1, nem nos DNAs extraídos a partir do sangue (figura 02), nem nos DNAs extraídos a partir do cérebro (figura 03), comprovando que os nossos camundongos não foram infectados por *T. gondii*. Para confirmarmos a não infecção, avaliamos a produção de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a anti-*T. gondii* no plasma desses camundongos, não sendo detectado anticorpo contra *T. gondii* no plasma dos camundongos infectados com o PBMC dos pacientes, sendo que os camundongos infectados com a cepa tipo II (ME49) apresentaram níveis altos dessas imunoglobulinas. (dados não mostrados).

Um dos objetivos do nosso trabalho era o isolamento do *T. gondii* para caracterização molecular e fenotípica das cepas do parasita. No entanto, não conseguimos o isolamento da cepa de *T. gondii* a partir de sangue de pacientes com toxoplasmose ocular aguda. Contudo, avaliamos as características de duas linhagens clonais: a cepa tipo I (RH) e tipo II (ME49) de *T. gondii*, bem como a cepa denominada tipo BrI (TgCatBR71) em relação a evolução da doença, produção de citocinas pró e antiinflamatórias, perfil de células CD4⁺ e CD8⁺ e expressão de moléculas de superfície em DCs de camundongos infectados, visando o entendimento das alterações que as cepas de *T. gondii* causam no sistema imune de camundongos na infecção aguda e na infecção crônica por este parasita.

O resultado da infecção por *T. gondii* depende do balanço entre o tempo de desenvolvimento de efetiva resposta imune celular e habilidade do parasita de se replicar e disseminar antes do reconhecimento imune. Estudos prévios têm sugerido que parasitas vivos de *T. gondii* devem destruir a interação inicial com células do sistema imune inato. Em macrófagos em repouso, a infecção inibe a localização nuclear dos fatores de transcrição STAT1 e NF- κ B (LUDER *et al.*, 2001; (BUTCHER *et al.*, 2001; SHAPIRA *et al.*, 2002; DENKERS, KIM & BUTCHER, 2003), suprimindo a super regulação da expressão de moléculas de superfície apresentadoras de peptídeo antigênico (MHC de classe I e MHC de classe II) em resposta ao IFN- γ (LUDER *et al.*, 2001) e limitando a produção de IL-12 e TNF- α em resposta ao LPS (BUTCHER *et al.*, 2001; SHAPIRA *et al.*, 2002).

As DCs são semelhantes a macrófagos, porém com uma capacidade maior em iniciar nova resposta imune (LIU & MACPHERSON, 1993; MELLMAN *et al.*, 1998) e, portanto possuem papel central no reconhecimento imunológico de patógenos estranhos (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). A maturação de DCs está associada com cessamento da endocitose, produção de citocinas inflamatórias (incluindo IL-12 e TNF- α), migração a linfonodos e aumento da expressão de moléculas de superfície como MHC classe II, CD40, CD80 e CD86, conferindo à DC madura a capacidade de ativar linfócitos T CD4⁺ naives (BANCHEREAU *et al.*, 2000; GUERMONPREZ *et al.*, 2002; MELLMAN & STEINMAN, 2001).

As análises das DCs esplênicas no decorrer da infecção pelas cepas tipo I, tipo BrI e tipo II revelou que houve um aumento no número de DC CD11c⁺ com a evolução da doença. Nos camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) e tipo BrI (TgCatBr71), os quais não

sobreviveram a fase aguda da doença, logo no 3º dia pós infecção já ocorreu um aumento na porcentagem dessas células, sendo mais significativa no grupo infectado pela cepa RH do que no grupo infectado pela cepa TgCatBr71 de *T. gondii*. Esse aumento na porcentagem de DC CD11c⁺ foi acompanhado de aumento no número total desse tipo celular, sendo possível concluir que houve expansão desta população no baço desses animais. No entanto o aumento na porcentagem dessas células observado no 5º dia de infecção por essas duas cepas não foi acompanhada por aumento no número absoluto de células CD11c⁺ (Figura 19 – Anexo02), sendo possível especular que houve diminuição ou morte de outras populações celulares, ocasionando esses aumentos nas porcentagens dessas células em tal período.

No grupo de camundongos infectados pela cepa tipo II (ME49), houve uma grande variação na porcentagem de DC CD11c⁺ com o decorrer da infecção, sendo que do 3º para o 5º dia a porcentagem dessas células praticamente duplicou, tendo havido aumento desta população celular como se constata na figura 19 no qual está expresso o número total de células CD11c⁺. No 15º dia de infecção houve diminuição no número absoluto e porcentagem desse tipo celular, sendo que o aumento na porcentagem no 30º dia de infecção deva ser decorrente, como citado anteriormente, de morte ou saída de outros tipos celulares do baço desses camundongos infectados por *T. gondii*. Essas variações podem ser uma projeção de como o sistema imune responde a infecção por esta cepa, no qual no quinto dia após a infecção ocorre a migração de células dendríticas da periferia para os órgãos linfóides secundários onde ocorrerá a ativação de células T. As DCs têm importante papel na produção de IL-12 no sistema nervoso central durante infecção crônica de *T. gondii* sugerindo que a produção continuada de IL-12 é essencial para prevenir reativação do parasita (FISCHER *et al.*, 2000; YAP *et al.*, 2000), o que também pode justificar o aumento no número de DC CD11c⁺ observado nos camundongos.

Straw *et al.* (2003) observou fenômeno semelhante tanto em camundongos infectados com *T. gondii* como em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, sugerindo que há um aumento no recrutamento ou na retenção de células dendríticas viáveis no baço durante infecção por ambos os patógenos.

Em relação a expressão de moléculas de superfície em DCs, Straw *et al.* (2003) demonstrou que no pico da infecção há um grande aumento na expressão de marcadores de ativação (MHC classe II, CD40, CD80 e CD86), sendo que essas expressões diminuem na

fase crônica.

Nossos dados de expressão da molécula de superfície CD40 no grupo de camundongos infectado pela cepa tipo I (RH) mostram que no terceiro dia após a infecção há aumento na porcentagem de células DC CD11c⁺ CD40⁺, havendo uma queda significativa na expressão dessas moléculas no quinto dia. O mesmo evento é visto no grupo de camundongos infectados pela cepa ME49, sendo que o aumento na porcentagem de células DC CD11c⁺ CD40⁺ no início da infecção é bastante sutil. Ao contrário, no grupo infectado pela cepa tipo BrI (TgCatBr71) a porcentagem de DC CD11c⁺ expressando CD40 aumentou com o decorrer da infecção, atingindo seu pico no 5º dia. A interação CD40-CD40L regula a produção de IL-12 pelas DCs e esta ligação parece ser um importante sinal de sobrevivência para as DCs (DE SMEDT *et al.*, 1998; MeLELLAN *et al.*, 2000).

Subauste *et al.* (1998) afirma que infecção por *T. gondii* causa uma rápida indução na expressão de CD80 e aumentada regulação da expressão de CD86 em monócitos humanos infectados com taquizoítas viáveis, com conseqüente aumento de expressão dessas duas moléculas de superfície. Em relação a porcentagem de DC CD11c⁺ CD80⁺ observada em nossos resultados, a infecção por *T. gondii* causa indução dessa molécula nos três grupos analisados (camundongos infectados pela cepa tipo I, tipo II e tipo BrI). Nos grupos infectados pela cepa RH e TgCatBr71 logo no terceiro dia de infecção já houve aumento em relação ao grupo controle, sendo que a porcentagem de células expressando CD80 se elevou ainda mais no quinto dia no grupo de animais infectados pela cepa RH. No grupo infectado pela cepa ME49 este aumento só é notável a partir do quinto dia, sendo que deste para o 15º dia ocorreu mais uma elevação na porcentagem de DC CD11c⁺ CD80⁺ que permaneceu ainda elevada no trigésimo dia pós-infecção.

A proliferação de células T é dependente de CD80 e CD86, e a indução/super regulação na expressão dessas moléculas está associada com a geração na síntese de IFN- γ por células T (SUBAUSTE *et al.*, 1998). Em nossos dados é possível observar que o pico na produção de IFN- γ ocorre no mesmo período em que houve aumento na porcentagem de células expressando a molécula CD80, sendo no 5º dia para os grupos infectados pelas cepas RH e TgCatBr71 e no 15º dia para o grupo infectado pela cepa ME49. Esses dados corroboram com os dados observados pelo grupo de Subauste *et al.* (1998), indicando que o CD80 está mesmo associado com a síntese de IFN- γ .

A análise da expressão de CD86 nas DCs CD11c⁺ revelou que não houve alteração na porcentagem dessas células no decorrer da infecção pela cepa tipo II de *T. gondii*. No entanto, em relação aos grupos de camundongos infectados pela cepa tipo I (RH) e tipo BrI (TgCatBr71) houve significativo aumento na porcentagem de DCs CD11c⁺ CD86⁺ logo no terceiro dia pós-infecção. A interação CD80/CD86–CD28 e CD40–CD40L controlam a síntese de IFN- γ mesmo na ausência de IL-12 bioativa, e também regulam a produção de IFN- γ através da direta co-estimulação de células T (SUBAUSTE & WESSENDRARP, 2000).

Observamos também que não houve grandes alterações na porcentagem de células expressando as moléculas de MHC classe II nas DC CD11c⁺ nos grupos analisados. Nos camundongos infectados pela cepa tipo II (ME49) houve um pequeno aumento na expressão dessa molécula no décimo quinto dia de infecção, sendo que no grupo infectado pela cepa tipo I (RH) esse aumento ocorreu no quinto dia. No entanto, em relação ao grupo infectado pela cepa TgCatBr71 houve aumento na porcentagem de células expressando esta molécula logo no início da infecção, permanecendo elevado até o quinto dia.

O maior mecanismo de resistência a infecções murinas por *T. gondii* parecem ser mediadas por células T (GAZZINELLI *et al.*, 1991; SUZUKI & REMINGTON, 1989). Estudos de transferência passiva realizada em camundongos infectados por este parasita indicam que células T CD8⁺ são as principais responsáveis pela resistência, embora significativa proteção pode também ser conferida por linfócitos T CD4⁺ (SUZUKI & REMINGTON, 1989). Tem sido proposto que além da produção de citocinas, as células T devem conferir proteção contra *T. gondii* por lise de células infectadas por parasitas (HAKIM *et al.*, 1991; SUBAUSTE, KONIARIS & REMINGTON, 1991; YANO *et al.*, 1989).

Em nosso trabalho avaliamos a porcentagem de células esplênicas CD4⁺ e de CD8⁺ no decorrer da infecção causada pelas cepas analisadas. Foi possível observar que, tanto em relação a porcentagem como em relação ao número absoluto de células T CD4⁺ houve diminuição desta população celular no decorrer da infecção pelas três cepas analisadas, sendo que para os grupo infectados respectivamente com a cepas RH e TgCatBr71 o nível mais baixo ocorreu no 5º dia de infecção e no grupo infectado pela cepa ME49 no 15º dia de infecção. Analisando a porcentagem e o número total de células CD8⁺ nota-se que houve uma redução desse tipo celular com o decorrer da infecção, sendo que nos grupos de animais infectados pelas cepas RH e TgCatBR71 uma substancial diminuição no número das células

CD8⁺ é observado no 5º dia de infecção, tal fato ocorrendo no 15º dia do grupo infectado com a cepa ME49. Apesar de no 30º dia da infecção pela cepa ME49 a porcentagem de células CD8⁺ estar aumentada, o mesmo não acontece com o número total dessas células, podendo-se inferir que houve diminuição de outros tipos celulares, fazendo aumentar esta porcentagem.

Estudos em modelo animal de infecção por *T. gondii* tem demonstrado o papel crítico das células T (GAZZINELLI *et al.*, 1991; SUZUKI & REMINGTON, 1989), em particular das células T CD8⁺ que parecem exercer sua atividade citolítica contra células infectadas por *T. gondii* (HAKIM *et al.*, 1991; SUBAUSTE, KONIARIS & REMINGTON, 1991). Células T CD4⁺ têm importante papel na manutenção da imunidade de células T CD8⁺ contra *T. gondii* (CURIEL *et al.*, 1993). As células T CD4⁺ provem a função auxiliar para geração e/ou atividade de células efetoras CD8⁺ e para indução da proteção de ambos os tipos celulares e atividade funcional de CD8⁺ (ISRAELSKI & REMINGTON, 1993; SUBAUSTE, KONIARIS & REMINGTON, 1991). Luder *et al.* (1998), observou que durante a infecção murina por *T. gondii* os linfócitos T CD8⁺ se expandem mais e são considerados mais efetores que as células T CD4⁺ (DENKERS *et al.*, 1997; SKLENAR *et al.*, 1986). Nossos achados contrapõem esses dados uma vez que não foi observada expansão das células CD8⁺ em nenhum dos grupos analisados. Luder *et al.* (1998) mostrou também que macrófagos infectados são completamente negativos para expressão de moléculas MHC classe II. Talvez, a falta de expressão dessas moléculas observada nas células dendríticas esplênicas analisadas em nossos experimentos possam ser decorrentes da infecção dessas células pelo parasita.

Em camundongos, o paradigma é que células T CD4⁺ podem ser separadas em subtipos com base na produção de citocinas, e que cada perfil de citocinas produzido por um tipo celular determina sua função. Este modelo inclui dois subtipos principais: células Th1 que produzem IL-2, IL-12 e IFN- γ e controlam a produção de anticorpo IgG2a, e células Th2 que produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e controlam a produção de IgG1 e IgE (FIORENTINO *et al.*, 1989; MOSMANN *et al.*, 1986).

Estudos prévios mostram que infecções por *T. gondii* conduzem a potente resposta Th1, que é necessária para controle da infecção em camundongos. Indução de IL-12 que conduz a produção de IFN- γ é essencial para controle da replicação do parasita e previne a morte por toxoplasmose em modelos murinos (GAZZINELLI *et al.*, 1993; GAZZINELLI *et al.*, 1994; HUNTER *et al.*, 1995). Infecções de camundongos com baixas doses da cepa tipo II resultam em resposta imune caracterizada por níveis moderados de IFN- γ , IL-12 e TNF- α ,

conduzindo a eventual controle da replicação do parasita e mínima patologia tecidual. Contudo, infecções letais estão associadas com indução sistêmica de altos níveis de IL-18, IFN- γ e IL-12 (MORDUE *et al.*, 2001).

Em discordância com os dados apresentados por Mordue *et al.* (2001), em nossos resultados observamos maior produção de IL-12 e IFN- γ nos camundongos infectados pela cepa do tipo II (ME49).

Nos camundongos infectados pela cepa tipo II (ME49), logo no terceiro dia pós-infecção é possível observar a produção de IL-12, que se mantém elevada até o décimo quinto dia de infecção. No entanto, no grupo infectado pela cepa tipo I (RH), não há significativo aumento em relação ao grupo controle na síntese desta citocina. Em contrapartida o grupo infectado pela cepa TgCatBr71 apresentou síntese elevada de IL-12p40 quando comparado ao grupo RH e ao grupo controle, no entanto abaixo dos níveis observado no grupo infectado pela cepa ME49. Corroborando nossos dados, Robben *et al.* (2004) mostrou que a linhagem tipo I de *T. gondii* falha na indução de apreciáveis níveis de citocinas Th1, prejudicando o hospedeiro na montagem de apropriada resposta imune local durante infecção aguda. Contrariamente, a precoce indução de IL-12 por cepas do tipo II devem contribuir para o efetivo controle e diminuição da virulência.

A falha das linhagens tipo I em induzir produção de IL-12 pode resultar em oportunidade para replicação do parasita, aumentando a virulência dessa infecção, enquanto a precoce ativação de efetores inatos pelo parasita da cepa tipo II pode conduzir a um melhor controle da replicação do parasita.

Em relação a produção de IFN- γ , houve elevada síntese desta citocina no 5º dia de infecção pela cepa tipo I (RH) e tipo BrI (TgCatBr71), fato que somente foi observado no grupo infectado pela cepa tipo II (ME49) a partir do 15º pós-infecção.

Quando analisada a síntese da citocina antiinflamatória IL-10, observou-se que no grupo infectado pela cepa tipo I (RH) houve significativa síntese desta citocina no 5º dia de infecção. No grupo infectado pela cepa tipo II (ME49) a síntese de IL-10 apenas se tornou elevada no 15º dia pós infecção, havendo ligeira queda no 30º dia. No grupo TgCatBr71 não houve produção significativa de IL-10 em nenhum tempo de infecção.

A cepa de *T. gondii* do tipo I causa infecção aguda letal caracterizada por irrestrita replicação do parasita a despeito da presença de altos níveis de IL-12 e IFN- γ . Em contraste, a cepa do tipo II (ME49) estimula a resposta imune protetora associada com altos níveis de IL-12 e IFN- γ . Durante infecção pela cepa ME49, a citocina IL-10 é requerida para prevenir a produção aumentada de IL-12, IFN- γ e TNF- α (GAZZINELLI *et al.*, 1992). No entanto a IL-10 não influencia a produção dessas citocinas durante infecção pela cepa RH de *T. gondii*, mostrando que a IL-10 não determina o resultado da infecção por esta cepa. Essa habilidade da cepa RH em sobreviver e replicar na presença de altos níveis de IFN- γ permanecem desconhecidos, sendo talvez ocasionados pela produção de outros fatores imunossupressores, tais como TGF- β , ou a alta taxa de replicação do parasita da cepa RH comparado a cepa ME49 podendo ditar o resultado letal da infecção pela cepa tipo I. (WILLE *et al.*, 2001).

Pouco se sabe sobre as características biológicas das cepas que tem sido isoladas no Brasil. Em relação a esta cepa TgCatBr71 (tipo BrI) sabe-se apenas que são altamente virulentas, sendo possível através deste trabalho inferir que se assemelham bastante com a cepa RH (tipo I) na indução da resposta imune do hospedeiro.

6 Conclusões

6 Conclusões

- a) Cepas do tipo I (RH) e cepa do tipo II (ME49) de *T. gondii* induzem aumento na porcentagem de DC CD11c⁺ esplênicas com o decorrer da infecção;
- b) Cepas do tipo I (RH) de *T. gondii* induzem aumento na porcentagem de DC CD11c⁺ expressando CD40, CD86 no 3º dia de infecção e de CD80 e MHC classe II a partir do 5º dia de infecção;
- c) Cepas do tipo BrI (TgCatBr71) induzem aumento na porcentagem de DC CD11c⁺ expressando CD40, CD80, CD86 e MHC classe II com o decorrer da infecção.
- d) Cepa do tipo II (ME49) de *T. gondii* induzem aumento na porcentagem de DC11c⁺ expressando CD80 e MHC de classe II a partir do 15º dia de infecção;
- e) Cepa do tipo I (RH) de *T. gondii* gera diminuição na porcentagem número absoluto de células CD4⁺ no 5º dia de infecção e um pequeno aumento de células CD8⁺ no 5º dia de infecção;
- f) Cepa do tipo BrI (TgCatBr71) causa redução tanto de células CD4⁺ como de células CD8⁺ com o decorrer da infecção;
- g) Cepa do tipo II (ME49) de *T. gondii* causa diminuição tanto de células CD4⁺ como de células CD8⁺ no 15º dia de infecção;
- h) Cepa tipo I (RH) de *T. gondii* estimulam produção de IFN- γ e IL-10;
- i) Cepa tipo II (ME49) de *T. gondii* estimula a produção de IL-12p40, IFN- γ e IL-10 em níveis substancialmente elevados;
- j) Cepa tipo BrI (TgCatBr71) de *T. gondii* estimulou a síntese de IL-12p40 e IFN- γ no grupo de camundongos infectados

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- AIKAWA, M.; KOMATA, Y., ASAI, T. MIDORIKAWA, O. Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. **Am. J. Pathol.**, v.2, p.285-296, 1977.
- AJIOKA, J. W.; BOOTHROYD, J. C.; BRUNK, B. P.; HEHL, A.; HILLIER, L.; MANGER, I. D.; MARRA, M.; OVERTON, G. C.; ROOS, D. S.; WAN, K. L.; WATERSTON, M.; SIBLEY, L. D. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the apicomplexa. **Genome Res.**, v. 8, p. 18–28, 1998.
- AJZENBERG, D., BANULS, A.L., SU, C., DUMETRE, A., DEMAR, M., CARME, B., DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 34(10):1185-1196; 2004
- ALEXANDER, J.; HUNTER, C. A. Immunoregulation during toxoplasmosis. **Chem. Immunol.**, v. 70, p.81-102, 1998..
- ANJUERE, F.; MARTÍN, P.; FERRERO, I.; FRAGA, M. L.; DEL HOYO, G. M., WRIGHT, N.; ARDAVÍN, C. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. **Blood.**, v. 2; 590-598, 1999.
- ARAUJO, M. I.; BLISS, S. K.; SUZUKI, Y.; ALCARAZ, A.; DENKERS, E. Y.; PEARCE, E. J. Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfecting with *Schistosoma mansoni* and *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immune.**, v. 69, 1454–1462, 2001.
- ARDAVÍN, F. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 582-590, 2003.
- ASAI, T., MIURA, S., SIBLEY, L. D., OKABAYASHI, H., TAKEUCHI, T. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **J. Biol. Chem.**, v. 270(19), p.11391-11397, 1995
- ASAI, T.; MIZUNO, F; KOJIMA, S; TAKEUCHI, T; KOBAYASHI, A; SUZUKI, Y. High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and an enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p.1291-1293, 1992.
- AUSTRYN, J. M. Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. **Semin. Immunol.** v. 4, p.227-236, 1992.
- AZUMA, M.; ITO, D.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L. L.; SOMOZA, C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. **Nature.**, v. 6450, p.76-79, 1993.
- BANCHEREAU J.; BRIERE F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v.18, p.767-811, 2000.
- BANCHEREAU J.; STEINMAN R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature.**, v.392(6673), p.245-252, 1998.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **J. Exp. Med.**, v.12, p.1625-1633, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Inddex Medicus.2006.Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>;
<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serial/lji.html>.

- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. American Society for Microbiology: **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64(3), p. 607-623, 2000.
- BOHNE, W., GROSS, U., HEESEMANN, J. Differentiation between mouse-virulent and -avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kilodalton antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v.31(6), p.1641-1643, 1993
- BONAMETTI, A. M., PASSOS, J. N., SILVA, E. M. K., BORTOLIERO, A. L. Surto de Toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30(1), p. 21-25, 1997.
- BOONSTRA, A.; ASSELIN-PATUREL, C.; GILLIET, M.; CRAIN, C.; TRINCHIERI, G.; LUI, Y. J.; O'GARRA, A. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. **J. Exp. Med.**, v. 1, p.101-109, 2003.
- BOOTHROYD, J. C. Population biology of *Toxoplasma*: clonality, virulence, and speciation (or not). **Infect Agents Dis.** v.2, p. 100-102, 1993.
- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 438-442, 2002.
- BOSSI, P. CAUMES, E.; PARIS, L.; DARDÉ, M. L.; BRICAIRE, F. *Toxoplasma gondii*-associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. **J. Clin. Microbiol.**, v. 12, p.3724-3725, 1998.
- BOURGUIN, I.; MOSER, M.; BUZONI-GATED, D.; TIELEMANS, F.; BOUT, D.; URBAIN, J.; LEO, O. Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. **Infect. Immun.**, v. 10, p.4867-4874, 1998
- BROOKS, R. G.; REMINGTON, J. S. Transplant-related infections. In: Bennett J. V, Brachman P. S, eds. Hospital infections. 2 ed. Boston: **Little, Brown and Co.**, p. 581-618. 1986.
- BRUSCHI, F.; CASTAGNA, B. The serodiagnosis of parasitic infections. **Parasitologia**, v. 46(1-2), p. 141-144, 2004.
- BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 1787-1792, 1989.
- BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. **Infec. and Immun.**, v. 70(9), p. 5216-5224, 2002.
- CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA, M. V.; TEIXEIRA, R. M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 46(4), p. 335-341, 2000.
- CAZENAVE, J.; CHEYROU, A.; BLOUIN, P. Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma*. **J. Clin. Pathol.**, v. 44, p. 1037, 1991.
- CELLA, M.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v.1, p.10-16, 1997.
- CURIEL, T.; KRUG, E.; PURNER, M.; POIGNARD, P.; BERENS, R. Cloned human CD41 cytotoxic T lymphocytes specific for *Toxoplasma gondii* lyse tachyzoite-infected target cells. **J. Immunol.**, v. 151, p. 2024-2031, 1993.
- D'ANDREA, A. D.; YOSHIMURA, A.; YOUSOUFIAN, H.; ZON, L.I.; KOO, J. W.; LODISH, H. F. The cytoplasmic region of the erythropoietin receptor contains nonoverlapping positive and negative growth-regulatory domains. **Mol. Cell. Biol.**, v. 4, p. 1980-1987, 1991.

- DARDÉ, M. L. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 219, p.27-41, 1996.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **J. Parasitol.**, v.5, p.786-794, 1992.
- DARDÉ, M. L.; VILLENA, I.; PINON, J. M.; BEGUINOT, I. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. **J. Clin. Microbiol.**, v. 1, p.324, 1998.
- DE SMEDT, T.; PAJAK, B.; KLAUS G. G.; NOELLE, R. J.; URBAIN, J.; LEO, O.; MOSER, M. Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo. **J. Immunol.**, v. 9, p.4476-4479, 1998.
- DENKER, E. Y. T lymphocyte dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 699-708, 1999.
- DENKERS E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; HIENV, S.; CASPAR, P.; SHER, A. Bone marrow macrophages process exogenous *Toxoplasma gondii* polypeptides for recognition by parasite-specific cytolytic T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 2, p. 517-526, 1993.
- DENKERS, E. Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 39, p. 193-203, 2003
- DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A.; DEL RIO, L.; BENNOUNA, S.; Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. **J. Parasit.**, v. 34, p. 411-421, 2004
- DENKERS, E. Y.; YAP, G.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHAREST, H.; BUTCHER, B. A.; CASPAR, P.; HEINY, S.; SHER, A. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** v. 4, p. 1903-1908, 1997.
- DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R. T.; Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin Microbiol Rev**, v.11, p.569-588, 1998.
- DIEZ, B.; NICOLAS, R.; GALDEANO, A.; CISTERNA, R.; CANAVATE, M. L. Kinetics and regulation of NK activity by interleukin-2 and interferon in acute toxoplasmosis. **Scand. J. Immunol.**, v. 34, p. 673-677, 1991
- DIFFEY, P.; SCOTT, J. O.; MAMA, K.; TSEN, T. N. The rate of proliferation among African trypanosomes is a stable trait that is directly related to virulence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, p.433-540, 1987.
- DIMIER-POISSON, I.; ALINE, F.; MÉVÉLEC, M. N.; BEAUVILLAIN, C.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. **Infect. Immun.**, v. 9, p. 5254-5265, 2003.
- DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell.**, v. 84, p.933-939, 1996.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.
- DUBEY, J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **J. Parasitol.** v. 82, p. 957-960, 1996.
- DUBEY, J. P. LINDSAY, D. S., SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11(2), p. 267-299, 1998.
- DUBEY, J. P. Long term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 910-913, 1988.
- DUBEY, J. P., FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **J. Protozool.**, v. 23, p. 537-546, 1976.

- DUBEY, J. P., MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **J. Exp. Med.**, v. 132, p. 636–662, 1970.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J. Protozool.**, v. 19, p. 155–177, 1972.
- DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M. C.; BANDINI, L. M.; YAI, L. E.; KWOK, C. H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **J. Parasitol.**, v.93, p.60-64, 2007a
- DUBEY, J. P.; PARNELL, P. G.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; De YOUNG, R. W.; DAHL, E.; LEHMANN, T. Biologic and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from striped skunk (*Mephitis mephitis*), Canada goose (*Branta canadensis*), black-winged lory (*Eos cyanogenia*), and cats (*Felis catus*). **J. Parasitol.**, v.5, p.11171-11174, 2004.
- DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. F.; DE OLIVEIRA, L. N.; LEIFER, C.A.; GENNARI, S. M.; BAHIA OLIVEIRA, L. LM.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.157 (3-4), p.299-305, 2008.
- DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Vet Parasitol.**, v.143, p.182-188, 2007b
- FERREIRA, A. M.; VITOR, R. T. G.; MELO, M. N.; Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infect Genet. Evol.**, v.6, p.22-31, 2006.
- FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W.; CARNEIRO, A. C.; BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). **Infect. Genet. Evol.**, v. 2, p.131-142, 2004.
- FINKELMAN, F. D., HOLMES, J., KATONA, I. M., URBAN, J. F., BECKMANN, M. P., PARK, L. S., SCHOOLEV, K. A., COFFMAN, R. L., MOSMANN, T. R., PAUL, W. E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p.303-333, 1990.
- FIORENTINO, B. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med** 170, 2081–2095, 1989.
- 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. 6; p. 2081-2095, 1989.
- FISCHER, H. G., BONÍFAS, U., REICHMANN, G. Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 9; p. 4826-4834, 2000.
- FOSTER, B. G., MCCULLOCH, W. F. Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*. **Can. J. Microbiol.**, v. 14, p. 103-110, 1968.
- FREEMAN, G.J.; BORRIELLO, F. HODES, R.J.; REISER, H. GRIBBEN, J.G.; NG, J.W.; KIM, J.; GOLBERG, J.M.; LASZLO, G et al. Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. **J. Exp. Med.**, v. 6, p..2185-2192, 1993.
- FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology. In: Hammond D M, Long P L, eds. The Coccidia. **Baltimore: University Park Press**, 1973. p. 343–410.
- FRENKEL, J. K.; PFEFFERKORN, E. R; SMITH, D. D; FISHBACK, J. L. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **Am. J. Vet Res.**, v. 52, p. 759-763, 1991.
- FREYRE, A.; DUBEY, J. P.; SMITH, D. D.; FRENKEL, J. K. Oocystinduced *Toxoplasma gondii* infections in cats. **J. Parasitol.**, v. 75, p. 750–755, 1989.

- FUENTES, I.; RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C. J.; DEL CASTILLO, F.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2368–2371, 1996.
- FUENTES, I.; RUBIO, J.M.; RAMIREZ, 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(4), p.1566-1570, 2001.
- GARCIA J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C.; GARCIA, S. M. F.; LEITE, J. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela Tela de Amslerr, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.45(3), p. 147-151, 2003.
- GAZZILNELLI, R.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 149, p. 175–180, 1992.
- GAZZINELLI, R. T., DENKERS, E. Y., SHER, A. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. **Infect. Agents. Dis.**, v. 2(3), p.139-149, 1993.
- GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent of CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ , and TNF- α . **J. Immunol.**, v. 157(2), p. 798-805, 1996.
- GAZZINELLI, R. T.; BREZIN, A.; LI, Q.; NUSSENBLATT, R. B.; CHAN, C.C. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α and IFN- γ . **Exp. Parasitol.**,v. 78, p.217–229, 1994.
- GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J. Immunol.**, v. 146, p. 286–292, 1991.
- GAZZINELLI, R. T.; HEINY S.; WYNN T. A.; WOLF S.; SHER A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 90(13), p.6115-6119, 1993.
- GAZZINELLI, R.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E.; HIENY S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A.. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 153(6), p.2533-2543. 1994
- GILBERT, R. E; STANFORD, M. R; Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? **Br. J. Ophthalmol.**, v. 84, p.224-226, 2000
- GILL, H. S; PRAKASH, O. A study on the active and passive immunity in experimental toxoplasmosis. **Indian J. Med. Res.**, v. 58, p. 1157-1163, 1970.
- GLASNER, P. D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MARTINS, M. C.; BURNIER, M. JR.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M. E.; NUSSENBLATT, R. B.; KASLOW, R.A.; BELFORT, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **Am. J. Ophthalmol.**, v.114, p. 136-144, 1992.
- GÓMEZ-MARÍN, J. E.; MONTOYA-DE-LONDOÑO, M. T.; CASTAÑO-OSORIO, J. C.; HEINE, F. A.; DUQUE, A.M.; CHEMLA, C.; AUBERT, D.; BONHOMME, A.; PINON, J. M. Frequency of Specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in Colombian Patients with Acute and Chronic Ocular Toxoplasmosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95(1), p. 89-94, 2000.
- GRAVRILESCU L. C.; DENKERS, E. Y. Interleukin-12 p40- and Fas Ligand-Dependent Apoptotic Pathways Involving STAT-1 Phosphorylation Are Triggered during Infection with a Virulent Strain of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v.71(5), p.2577-2583, 2003.

- GRAVRILESCU, L. C.; DENKERS, E. Y. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. **J. Immunol.**, v.167, p.902–909, 2001.
- GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, v.184, p.633–639, 2001.
- GROSS, U., HOLPERT, M., GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Ann. Ist. Super. Sanità**, v. 40(1), p. 65-70, 2004.
- GROSS, U.; BOHNE, W.; SOËTE, M.; DUBREMETZ, J. F. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 12(1), p.31-33, 1996.
- GUERMONPREZ P, VALLADEAU J, ZITVOGEL L, THERY C, AMIGORENA S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p.621-667, 2002.
- HAKIM, F. T.; GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. **J. Immunol.**, v.147, p. 2310-2316, 1991.
- HASKO, G.; VIRAG, L.; EGNACZYK, G.; SALZMAN, A. L.; SZABO, C. The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. **Eur. J. Immunol.**, v.28, p.1417–1425, 1998
- HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J. COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, v. 1, p. 59-72, 1989.
- HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim Health Res Rev.**, v.1, p.41-61, 2005.
- HIRAI, K.; HIRATO, K.; YANAGAWA, R. A cinematographic study of the penetration of cultured cells by *Toxoplasma gondii*. **Jpn. J. Vet. Res.**, v.14, p. 81–99, 1966.
- HOLLAND, G. N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 136(6), p.973-988, 2003.
- HOLLAND, G. N; Ocular toxoplasmosis: new directions for clinical investigation. **Ocul. Immunol. Inflamm.**, v. 8, p. 1-7, 2000.
- HONORE S.; COUVELARD A.; GARIN Y. J.; BEDEL C.; HENIN D.; DARDE M. L.; DEROUIN F. [Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients] **Pathol. Biol.**;v. 48(6), p.541-547, 2000.
- HOWE, D. K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.1411–1414, 1997.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, D. L.; *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J. Infect Dis.**, v.172, p. 1561-1566, 1995.
- HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C.; SIBLEY, L. D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v.64, p.5193–5198, 1996.
- HUNTER, C. A.; CANDOLFI, E.; SABAUSTE, C.; VAN CLEAVE, V.; REMINGTON, J. S. Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. **Immunology.**, . v. 84(1), p. 16-20, 1995.
- HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infect. Immun.** v. 62, p.2818–2824, 1994.

- HUNTER, C.A.; BERMUDEZ, L.; BEERNIK, H.; WAEGELL, W.; REMINGTON, J. S. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. **Eur. J. Immunol.** v.4; p.994-1000, 1995.
- INABA, K.; METLAY, J. P.; CROWLEY, M. T. STEINMAN R. M. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. **J. Exp. Med.** v. 2, p. 631-40, 1990.
- ISRAELSKI, D. M.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. In: Remington J, Swartz M, eds. Current clinical topics in infectious diseases. London: Blackwell Scientific Publications, 1993, p. 322–356.
- JOHNSON, A. M.; MCDONALD, P. J.; NEOH, S. H. Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. **J. Protozool**, v.30, p.351-356, 1983.
- JOHNSON, L. L. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. **Infect. Immun.**, v. 60, p.3719–3724, 1992.
- JONES, T. C.; YEH, S.; HIRSCH, J. G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. **J. Exp. Med.**, v. 136, p.1157–1172, 1972.
- KAUFMANN S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, .v. 11, p. 129-163, 1993.
- KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT JR, R.; VITOR, R. W. A.; SILVEIRA, C.;SIBLEY L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 942-949, 2006.
- KHAN, I. A.; ELY, K. H.; KASPER, L. H. Antigen-specific CD8⁺ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J. Immunol.**, v.152, p.1856–1860, 1994.
- KING, C. A. Cell motility of sporozoan protozoa. **Parasitol. Today.** , v. 4, p. 315–319, 1988.
- KOHLER, S.; DELWICHE, C. F.; DENNY, P. W.; TILNEY, L. G.; WEBSTER, P.; WILSON, R. J. M.; PALMER, J. D.; ROOS, D. S. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. **Science.**, v. 275, p. 1485–1489, 1997.
- KONG, J. T.; GRIGG, M.E.; UYETAKE, L.; PARMLEY, S.; BOOTHROYD, J.C. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. **J. Infect. Dis.**, v.187(9), p.1484-1495, 2003.
- LAPPALAINEN, M.; HEDMAN, K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. **Ann. Ist. Super Sanità.**, v. 40(1), p. 81-88, 2004.
- LARSEN, C. P.; STEINMAN, R. M.; WITMER-PACK, M.; HANKINS, D. F.; MORRIS, P. J.; AUSTUN, J. M. Migration and maturation of langerhans cells in skin transplants and explants. **J. Exp. Med.**, v.5, p.1483-93, 1990.
- LEHMANN, T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; BAHIA-OLIVEIRA L. M.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infect Genet. Evol.**, . v. 2, p.107-14, 2004.
- LEHMANN, T.; MARCET, P.L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl. Acad. Sci.**, v.103, p.11423-11428, 2006.
- LEVINE, B. L.; UEDA, Y.; CRAIGHEAD, N.; HUANG, M. L.; JUNE, C. H. CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4⁺ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. **Int. Immunol.** v 6, p..891-904, 1995.
- LINDBERG, R. E.; FRENKEL, J. K. Cellular immunity to toxoplasma and besnoitia in hamsters: specificity and the effects of cortisol. **Infect. Immun.**, v. 3, p. 855-862, 1977.

- LINSLEY P. S.; LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p.191-212, 1993.
- LIU L. M.; MacPHERSON C. G. Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 177(5), p. 1299-307, 1993
- LÜDER, C. G.; LANG, T.; BEUERLE, B.; GROSS, U. Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. **Clin. Exp. Immunol.** v. 2, p. 308-316, 1998.
- LÜDER, C. G.; WALTER, W.; BEUERLE, B.; MAEURER, M. J.; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. **Eur. J. Immunol.**, v. 5, p. 1475-1484, 2001.
- LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clin. Infect. Dis.** v. 2, p.211-222, 1992.
- MACATONIA, S. E.; HOSKEN N. A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C. S.; CULPEPPER, J. A.; WVSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v. 10, p. 5071-5079, 1995.
- MASIHI, K. N.; WERNER, H. The effect of passively transferred heterologous serum on *Toxoplasma gondii* in NMRI mice. Influence of the treatment on course of infection and cyst formation. **Zentralbl Bakteriol [Orig A]**, v. 240, p.135-142, 1978.
- McLELLAN, A.; HELDMANN, M.; TERBECK, G.; WEIH, F.; LINDEN, C.; BRÖCKER, E.B.; LEVERKUS, M.; KÄMPGEN, E. MHC class II and CD40 play opposing roles in dendritic cell survival. **Eur. J. Immunol.** v. 9, p. 2612-2619, 2000.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. **Trends Microbiol.**, v. 10, p.452-456, 2000.
- MELLMAN I.; STEINMAN R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106(3), p.:255-258, 2001.
- MELLMAN, I.; TURKEY, S. J.; STEINMAN, R. M. Antigen processing for amateurs and professionals. **Trends Cell Biol.**, v..6, p.231-237, 1998.
- MILLER, M. A.; GRIGG, M. E.; KREUDER, C.; JAMES, E. R.; MELLI, A. C.; CROSBIE, P. R.; JESSUP, D. A.; BOOTHROYD, J. C.; BROWNSTEIN, D.; CONRAD, P.A. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. **Int. J. Parasitol.**, v.34(3), p.:275-284, 2004.
- MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Reviews:Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p.1965-1976, 2004.
- MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p.683-765, 2001.
- MORDUE, D. A.; MONROY F.; LA REGINA, M.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. **J. Immunol.**, v.167(8), p. 4574-4584, 2001.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.** v. 7, p. 2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, p. 2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p.145-173, 1989.

- MOZZATTO, L.; SOEIBELMANN PROCIANO, R. Incidence of Congenital Toxoplasmosis in Southern Brazil: a Prospective Study. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 45(3), p. 147-151, 2003.
- NGUYEN, T. D.; BIGAIGNON, G.; MARKINE-GORIAYNOFF, D.; HEREMANS, H.; NGUYEN, T. N., WARNIER, G.; DELMEE, M.; WARNY, M.; WOLF, S. F.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, J., COUTELIER, J. P. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and α -interferon. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 869–876, 2003.
- NGUYEN, T. D.; DE KESEL, M.; BIGAIGNON, G.; HOET, P.; PAZZAGLIA, G.; LAMMENS, M.; DELMEE, M. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of infected mice. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 6, p.635-639, 1996.
- NICHOLS, B. A.; O'CONNOR, R. G. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. **Lab. Investig.**, v. 44, p.324–355, 1981.
- NICOLL, S.; BURNS, S. M.; BRETTE, R. P.; LEEN, C. S. L. A comparison of two methods of gene amplification for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* in AIDS. **J. Infect.**, v. 33, p. 177–183, 1996.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de leishman (ou organisms voisins) de Gondii. **Compt. Rend. Acad. Sci.**, v. 147, p. 763-766, 1908.
- PARMLEY, S. F.; YANG, S.; HARTH, G.; SIBLEY, L. D.; SUCHARCZUK, A.; REMINGTON, J. S. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 2, p. 283-296, 1994.
- PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int. J. Parasitol.**, v.38(5), p.561-569, 2007.
- REICHMANN, G. WALKER, W.; VILLEGAS, E. N.; CRAIG, L.; CAI, G.; ALEXANDER, J.; HUNTER, C. A.; The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. **Infect. Immun.**, v. 3, p.1312-8, 2000.
- REIS E SOUZA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1819-1829, 1997.
- RIOS, L. S.; OLIVEIRA, N. N.; FALCAI, A.; SILVEIRA, C.; MUCCIOLL, C.; BELFORT R.; RIZZO, L. V.; VALLOCHI, A. L. Correlation between humoral immune response and toxoplasmic retinochoroiditis. **In press**
- ROBBEN, P. M.; MORDUE, D. G.; TRUSCOTT, S. M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SIBLEY, L.D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **J. Immunol.** v.6; p. 3686-3694, 2004.
- ROBERTS, F; McLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitol Today.** v. 15, p. 51-57, 1999.
- RONDAY, M. J. H.; ONGKOSUWITO, J. V.; ROTHOVA, A.; KIJLSTRA, A. Intraocular anti- *Toxoplasma gondii* IgA antibody production in patients with ocular toxoplasmosis. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 127(3), p. 294-300, 1999
- SAEJI, J.P.J.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends Parasitol.** , v. 10, p.476-481 2005.
- SALLUSTO, F; CELLA, M. DANIELI, C. LANZAVECCHIA A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.** v. 2, p.389-400, 1995.
- SAYLES, P.C.; JOHNSON, L.L. Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v. 8, p. 3088-3092, 1996.

- SCHLÜTER, D.; LÖHLER, J. DECKERT, M.; HOF, H.; SCHWENDEMANN, G. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterization of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. **J. Neuroimmunol.** v. 3, p.185-198, 1991.
- SCHULZ, O.; EDWARDS, A. D.; SCHITO, M.; ALIBERTI, J.; MANICKASINGHAM, S.; SHER, A.; REIS E SOUZA, C. CD40 triggering of heterodimeric IL-12p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. **Immunity.** v. 4, p.453-462, 2000.
- SEGUIN, R.; KASPER L. H. Sensitized lymphocytes and CD40 ligation augment interleukin-12 production by human dendritic cells in response to *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.**, v.179, p.467-74, 1999.
- SHAPIRA, S.; HARB, O. S.; CAAMANO, J.; HUNTER, C. A. The NF-kappaB signaling pathway: immune evasion and immunoregulation during toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.** v.3, p.393-400, 2004.
- SHARMA, S. D.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** v. 133, p. 2818-2820, 1984.
- SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L.. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.** v. 54, p.209-226, 1968.
- SHER A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annu Rev. Immunol.**, v.10, p.385-409, 1992.
- SHER, A.; OSWALD, I. O.; HIENY, S.;GAZZINELLI, R. T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in NK cells which requires both adherent accessory cells and TNF- α . **J. Immunol.**, v.150, p. 3982-3989, 1993.
- SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat. Rev. Immunol.** v. 3, p.151-61, 2002.
- SIBLEY, L. D., BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature.** v.359(6390), p.82-85, 1992
- SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v.359, p. 82-85, 1992.
- SIBLEY, L. D.; MORDUE, D.G.; SU, C.; ROBBEN, P.M.; HOWE, D.K. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. **Philos. Trans. R. Soc.**, v.357, p.81-88, 2002.
- SILVEIRA C.; FERREIRA R.; MUCCIOLI C.; NUSSENBLATT R.; BELFORT R. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 136, p.370-371. 2003
- SILVEIRA, C. A. M. **Toxoplasmose: dúvidas e controvérsias.** Rio Grande do Sul, Edifapes, 2002, 57 p.
- SILVEIRA, C.; BELFORT, R. JR.; BURNIER, M. JR; NUSSENBLATT, R. B. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. **Am J Ophthalmol.** v. 106, p.362-364, 1988.
- SILVEIRA, C.; BELFORT, R.; MUCCIOLI, C.; ABREU, M. T.; MARTINS, M. C.; VICTORIA, C.; NUSSENBLATT, R. B.; HOLLAND, G. N. A Follow-up Study of *Toxoplasma gondii* Infection in Southern Brazil. **Am. J. Ophthalmol.** v. 131, p. 351-354, 2001.
- SILVEIRA, F.; SILVEIRA, L.; SILVEIRA, C. **Toxoplasmose ocular.** In: CURSOS DE UVEÍTES. Bogotá, Clínica Barraquer, 1975.
- SKLENAR, I.; JONES, T.C.; ALKAN, S.; ERB, P. Association of symptomatic human infection with *Toxoplasma gondii* with imbalance of monocytes and specific T cell subsets. **J. Infect. Dis.** v. 2, p.315-324, 1986.

- SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; RIBEIRO, L. C.; SILVEIRA, C.; GARCIA, A. P.; CAMILLO-COURA, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34(4), p. 483-491, 2003.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli: incontrato nell'lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uomo. **Rev. Soc. Sci.**, v. 3, p. 109-112, 1908.
- STEINMAN, L. Prospects for immunotherapy directed to the T cell receptor in human autoimmune disease. **Ann. N Y Acad. Sci.** v. 30, p.147-153, 1991.
- STEINMAN, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology **APMIS**, v.111(7-8), p.:675-697, 2003.
- STRAW, A. D.; MacDONALD, A. S.; DENKERS, E. Y.; PEARCE, E. J. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. **J. Immunol.**, v. 2, p. 727-734, 2003.
- SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P.; Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **Int. J. Parasitol.**, v.36, p.841-848, 2006.
- SUBAUSTE, C. S., REMINGTON, J. S. Immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr. Opin. Immunol.**, v.5, p.:532-537, 1993.
- SUBAUSTE, C. S., WESSENDARP, M. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation alter infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell production of IFN- γ . **J. Immunol.**, v.165(3), p.1498-1505, 2000.
- SUBAUSTE, C. S.; deWALL MALEFYT, R.; FUH, F. Role of CD80 (B7.1) and CD86 (b7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. **J. Immunol.**, v. 160, p. 1831-1840, 1998.
- SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. **J. Immunol.**, v.147, p. 3955-3959, 1991.
- SUBAUSTE, C. S.; WESSENDRAP, M.; SORENSEN, R. U.; LEIVA, L. E. CD40-CD40 ligand interaction is central to cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii*: patients with hyper IgM syndrome have a defective type 1 immune response that can be restored by soluble CD40 ligand trimer. **J. Immunol.**, v. 11, p. 6690-6700, 1999.
- SUZUKI Y.; REMINGTON J. S. The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. **J. Immunol.** v. 5, p. 1954-1956, 1990.
- SUZUKI, Y.; CONLEY, F. K.; REMINGTON, J. S. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. **J. Immunol.**, v. 6, p. 2045-2050, 1989.
- TAYLOR, L. H.; WELBURN, S. C.; WOOLHOUSE, M. E. *Theileria annulata*: virulence and transmission from single and mixed clone infections in cattle. **Exp. Parasitol.** v. 3, p.186-195, 2002.
- TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitology**, v. 30 (12-13), p. 1217-1258, 2000
- TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; UNANUE, E. R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.90, p.3725-3729, 1993.
- TURNER, C. M.; ASLAM, N.; ANGUS, S. D. Inhibition of growth of *Trypanosoma brucei* parasites in chronic infections. **Parasitol. Res.** v. 1, p.61-66, 1996.
- VALLOCHI A. L.; YAMAMOTO, J. H.; SCHLESINGER, D.; MACHADO, M. A.; SILVEIRA, C.; MARTINS, M.C.; BELFORT, R.; KALIL, J.; RIZZO, L. V. Lack of evidence for superantigen activity of *Toxoplasma gondii* towards human T cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 34, p. 1023-1031, 2001.

- VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R.; RIZZO, L.V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 139(2), p.:350-351, 2005.
- VALLOCHI, A. L.; NAKAMURA, M.V.; SCHLENSINGER, D.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT JR, R.; RIZZO, L. V. Ocular Toxoplasmosis: More Than Just What Meets the Eye. **Scand J. Immunol.**, v. 55, p. 324-328, 2002.
- VIVIER, E.; PETITPREZ, A. Données ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques, sur *Toxoplasma gondii*. **Protistologica**. v. 8, p. 199-221, 1972.
- WARE, P. L.; KASPER, L. H. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v.3, p.778-783, 1987.
- WATTS, C.; AMIGORENA, S. Antigen traffic pathways in dendritic cells. **Traffic**. v. 4, p. 312-317,2000.
- WILLE, U.; VILLEGAS, E. N.; STRIEPEN, B.; ROOS, D. S.; HUNTER, C. A. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.** v. 6; p. 291-296, 2001.
- WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**. v. 7, p. 299–316, 1993.
- YAMAMOTO, J. H.; VALLOCHI, A L.; SILVEIRA, C.; FILHO, J. K.; NUSSENBLATT, R. B.; CUNHA-NETO, E.; GAZZINELLI, R. T.; BELFORT 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.
- YANO, A.; AOSAI, F.; OHTA M.; HASEKURA, H.; SUGANE, K.; HAYASHI, S. Antigen presentation by *Toxoplasma gondii*-infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells. **J. Parasitol.**, v. 75, p.411-416, 1989.
- YAP, G.; PESÍN, M.; SHER, A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** v. 2, p. 628-631, 2000.
- YAP, G.S.; SHER, A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. **Immunobiology**. v.2, p.240-247, 1999.

Anexos

Anexos

Anexos 01

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO EXPERIMENTAL

ESTUDO: **Caracterização molecular e funcional de cepas de *T. gondii* isoladas a partir de pacientes com retinocoroidite toxoplásmica.**

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado na qualidade de indivíduo controle. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, (nome e profissão)....., residente e domiciliado na , portador da Cédula de identidade, RG , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em ____ / ____ / ____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “Caracterização molecular e funcional de cepas de *T. gondii* isoladas a partir de pacientes com retinocoroidite toxoplásmica.”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

O principal objetivo deste estudo é caracterizar as diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* que infectam esta população, bem como estudar as diferentes respostas imunes desencadeadas por estas cepas de *T. gondii* em modelo animal. Você está sendo convidado a participar deste estudo, pois apresenta problemas no olho devido ao *Toxoplasma*. Visamos estabelecer a relação entre as diferentes cepas de *T. gondii* com padrões de resposta imunológica, permitindo assim um melhor entendimento para o tratamento ideal da doença.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada “**toxoplasmose ocular**”;
- II) Serão realizados:
 - a) exame oftalmológico completo que consistirá de um exame externo do olho, medida da pressão intra-ocular e exame de fundo de olho. Este exame faz parte da rotina numa consulta oftalmológica.
 - b) exame de sangue consistirá de não mais de 150 ml de sangue periférico a serem extraídos em um intervalo de 6 meses, sendo que cada amostra será de não mais de 50 ml, totalizando cerca de 3 amostras. Os riscos da retirada de sangue são hematoma local (rouxidão), algum desconforto e, raramente, tontura.
- III) Essa(s) coleta(s) será(o) feita(s) apenas para este estudo e em nada influenciará (influenciarão) o meu tratamento; não vai (vão) me curar; não vai (vão) me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).
- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Estes estudos podem melhorar o entendimento da doença levando a formas mais eficazes de diagnóstico e tratamento no futuro. É provável que o voluntário em questão não seja beneficiário direto destes avanços.

A adoção de alguns cuidados específicos para prevenção da toxoplasmose é vantajosa para você. Estes cuidados consistem em: ingestão de carnes cozidas ou bem passadas, leite pasteurizado e fervido, água filtrada e tratada, lavagem de verduras e frutas, bem como evitar a criação de gatos, o hospedeiro definitivo da toxoplasmose.

Quaisquer dúvidas, que possam ocorrer com relação a esse estudo, poderão ser contatados: Dr. Cláudio Silveira na Clínica Silveira, Avenida sete de setembro, 1502 Erechim – RS, telefone (54) 321-1900. Lilia da Silva Rios ou Dr. Luiz Vicente Rizzo na Universidade de São Paulo, Laboratório de Imunologia Clínica, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo –SP 05508-900, telefone (11) 3091 7394.

São Paulo, de de 200 .

() Paciente / () Responsável

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____
Natalia Nepomuceno de Oliveira

Anexo 02

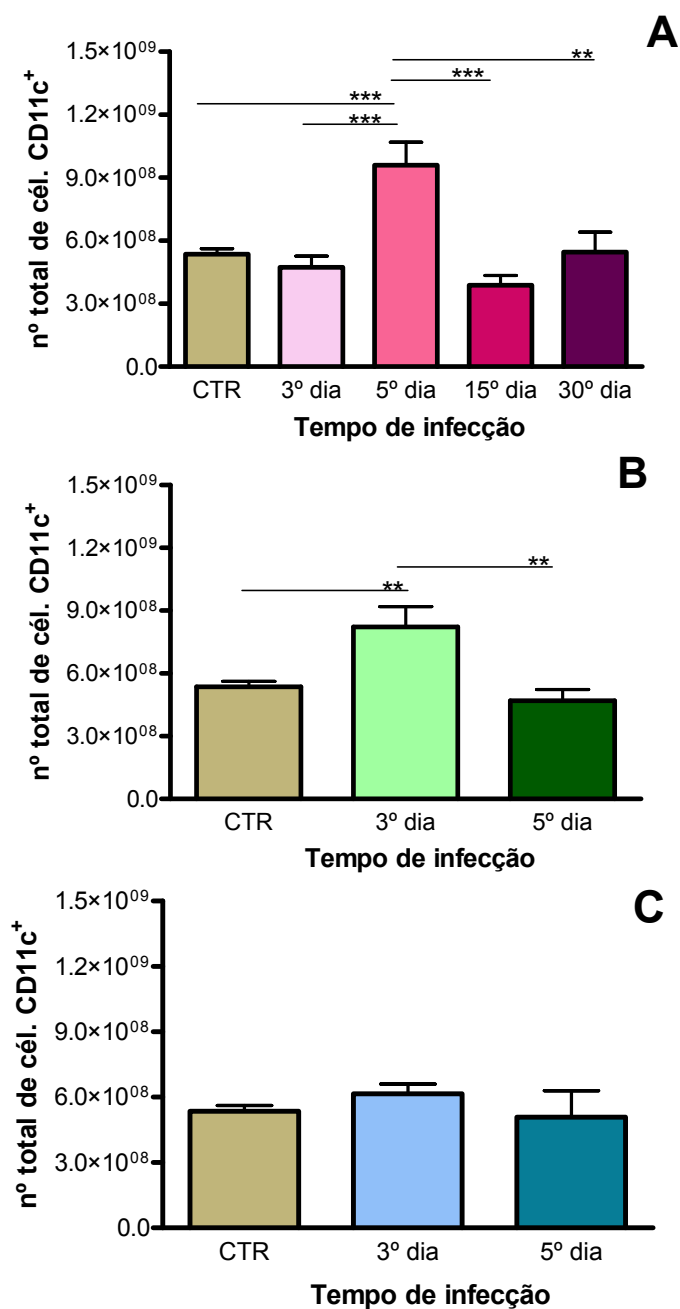


Figura 19 – Número total de CD11c⁺ esplênicas. O gráfico A representa o número total de DC CD11c⁺ no grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) em quatro fases da infecção e no grupo de animais controle negativo. No gráfico B e C é mostrado o número absoluto de DC CD11c⁺ em camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) e tipo BrI (TgCatBr71) respectivamente, em duas fases de infecção por *T. gondii* e o grupo controle negativo. Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média ± desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Anexo 03

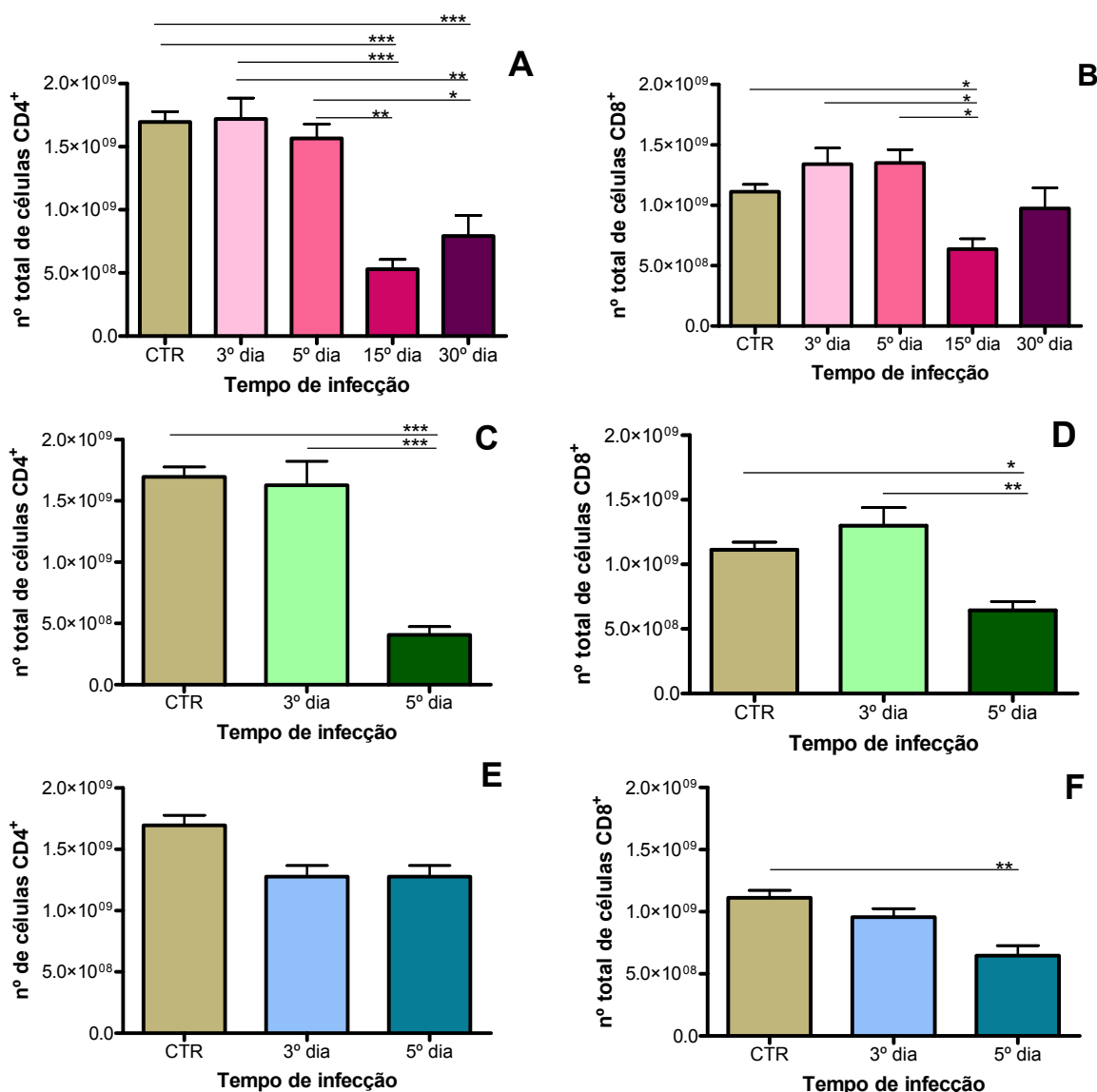


Figura 20 – Avaliação do número total de células CD4⁺ e CD8⁺ esplênicas. O gráfico A e B representam o número total de células esplênicas CD4⁺ e CD8⁺ (respectivamente) no grupo de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa tipo II (ME49) em quatro fases da infecção e no grupo de animais controle negativo. O gráfico C e D mostram, respectivamente, o número total de células esplênicas CD4⁺ e CD8⁺ em camundongos infectados com a cepa tipo I (RH) em duas fases de infecção por *T. gondii* e o grupo controle negativo, bem como os gráficos E e F o número absoluto de células CD4⁺ e CD8⁺ no grupo de animais infectados com a cepa tipo BrI (TgCatBr71). Para cada tempo de infecção com as diferentes cepas foram utilizados 5 camundongos, bem como para o grupo controle negativo, sendo que cada experimento foi realizado duas vezes. Os resultados são dados pela média ± desvio padrão. Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad versão 4.0 com o teste One-way ANOVA e Tukey. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p,0,001).

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](#)