



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

ÁUREA WELTER

INFESTAÇÃO PRÉVIA COM *MYOCOPTES MUSCULINUS*
ALTERA A RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR *TOXOPLASMA*
GONDII

UBERLÂNDIA-MG
2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

ÁUREA WELTER

INFESTAÇÃO PRÉVIA COM *MYOCOPTES MUSCULINUS*
ALTERA A RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR *TOXOPLASMA*
GONDII

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientadora: Dr^a. Neide Maria da Silva
Co-orientador: Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA-MG
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

W464i Welter, Áurea, 1975-

Infestação prévia com *Myocoptes musculus* altera a resposta imune induzida por *Toxoplasma gondii* / Áurea Welter. - Uberlândia, 2005. 89f. : il.

Orientador: Neide Maria da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. *Myocoptes* - Teses. 4. Infestações por ácaros - Teses. I. Silva, Neide Maria da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.993.1

AGRADECIMENTOS

Á Dr^a Neide Maria da Silva, pela orientação e apoio nas horas decisivas.

Ao Dr. José Roberto Mineo pela contribuição e incentivo na realização deste trabalho.

Á Deise Aparecida de Oliveira e Silva pelas sugestões e contribuição na realização deste trabalho.

Á Dr^a Eloísa Amália Ferro pelo auxílio na realização das técnicas de coloração e obtenção das imagens.

Á Dr^a. Ana Maria Aparecida Guaraldo do Laboratório de Parasitologia da Universidade de Campinas, pela identificação do ectoparasito em estudo.

Á Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira e Dr^a. Elaine Vicente Lourenço do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela colaboração na dosagem das citocinas.

Aos técnicos do Laboratório de Imunologia, Tomas Antonio Júnior e Maria Andréia Pires Rodrigues e aos secretários da Pós-Graduação Luceleide Freitas Queiroz Damásio e João Martins Neto e do Laboratório de Imunologia, Max Aor Marques que contribuíram para o andamento desse estudo.

Aos colegas de Curso e do Laboratório de Imunoparasitologia e Biologia Molecular, em especial à Cristina, Danielle, Eneida, Carla, Flávio, Fernanda Caroline, Heliana, Jair Júnior, Karine Oliveira, Karine Rezende, Karine Spirandelli, Márcio e Mônica pelo incentivo e amizade.

Aos meus pais, irmãos e irmã pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1-INTRODUÇÃO	5
1.1 Acariase	5
1.2 Morfologia do parasito	8
1.3 Taxonomia e Ciclo Biológico	9
1.4 Resposta Imune a <i>Myocoptes musculus</i>	10
1.5 <i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose	11
1.6 Morfologia do parasito	13
1.7 Taxonomia e Ciclo Biológico	15
1.8 Resposta Imune a <i>Toxoplasma gondii</i>	16
<i>Toxoplasma gondii</i> frente a coinfeção com organismos infecciosos indutores de resposta imune Th2	17
2- OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3-MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Animais e organismos infecciosos	21
3.2 Ensaio de infecção experimental	21
3.3 Determinação entomológica do ácaro	21
3.4 Infecção experimental e coleta de material	22
3.5 Contagem de eosinófilos	23
3.6 Coloração por Hematoxilina-Eosina	24
3.7 Coloração por Azul de Toluidina	24
3.8 Reação de imunohistoquímica para observação de <i>Toxoplasma gondii</i> no SNC	24
3.9 Análise Histológica	26
3.10 Preparo do extrato antigênico de <i>Myocoptes musculus</i>	26
3.11 ELISA para determinação dos níveis de anticorpos IgG anti- <i>Myocoptes</i> <i>musculus</i>	27
3.12 ELISA para determinação dos níveis de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	28
3.13 ELISA para determinação dos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	29

3.14 Cultivo de células do baço para a produção de citocinas	29
3.15 Dosagem de citocinas	30
3.16 Análise Estatística	32
4- RESULTADOS	33
4.1 Infecção experimental de camundongos BALB/c e C57BL/6 com <i>Myocoptes musculinus</i>	33
4.2 Mortalidade de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intraperitoneal com 10 cistos da cepa ME-49 de <i>Toxoplasma gondii</i>	36
4.3 Níveis de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	37
4.4 Níveis de anticorpos IgG1 anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	40
4.5 Níveis de anticorpos IgG2a anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	42
4.6 Níveis de anticorpos IgG anti- <i>Musculinus musculinus</i>	44
4.7 Quantificação de eosinófilos no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57BL/6	46
4.8 Cinética da secreção das citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10 por células do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 cultivados na presença de diferentes estímulos	48
4.9 Alterações inflamatórias nos órgãos periféricos e SNC de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 7, 14, 21 e 30 dias de infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	61
4.10 Mortalidade de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de <i>Toxoplasma gondii</i>	64
4.11 Alterações inflamatórias no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 sete dias após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de <i>Toxoplasma gondii</i>	65
4.12 Avaliação do número de mastócitos no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 sete dias após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de <i>Toxoplasma gondii</i>	68
4.12.1 Quantificação de mastócitos no duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo de camundongos BALB/c e C57BL/6	68
4.12.2 Quantificação de mastócitos no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6	69
5-DISCUSSÃO	71
6-CONCLUSÕES	78
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid
BSA	soroalbumina bovina
ConA	concanavalina A
DAB	3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DO	densidade óptica
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
g	Grama
IE	índice ELISA
IFN- γ	interferon γ
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgE	imunoglobulina E
IgM	imunoglobulina M
IL	interleucina
INDO	indoleamina 2,3- dioxigenase
iNOS	sintase do óxido nítrico induzível
IRF-1	fator 1 regulado por IFN- γ
LEA	Laboratório de Experimentação Animal
mg	miligramas
mL	mililitros
MAUD	mite-associated ulcerative dermatitis (dermatite ulcerativa associada ao ácaro)
M	Molar
ng	nanogramas
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico

PAS	ácido perclórico de Schiff
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
PBS-T+ BSA	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e soroalbumina bovina
PBMC	célula mononuclear do sangue periférico
PBS-T- M	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e molico
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
SMAg	antígeno de <i>Myocoptes musculus</i>
STAg	antígeno solúvel de taquizoíta
Th1	linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	linfócito T <i>helper</i> 2
<i>var</i>	variedade
x <i>g</i>	vezes a gravidade
μL	microlitros
μm	micrometro
μM	micromolar
μg/mL	micrograma por mililitro
%	por cento/porcentagem
°C	graus celsius

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório que induz uma resposta imune Th1 em camundongos resistentes, BALB/c e susceptíveis C57BL/6 a este parasito. *Myocoptes musculus* é um ácaro que induz uma resposta imune Th2. Neste estudo, nós investigamos se a infestação crônica com *M. musculus* influencia na imunopatologia e desenvolvimento da resposta Th1 induzida por *T. gondii*, em camundongos BALB/c e C57BL/6. Os camundongos foram infestados com *M. musculus* e um mês após infectados intraperitonealmente (10 cistos) ou oralmente (100 cistos) com a cepa ME-49 de *T. gondii* sendo a mortalidade e resposta imune avaliadas. Nós observamos que a infestação pelo ácaro acelerou a mortalidade de animais infectados oralmente com 10 cistos de *T. gondii* nas linhagens BALB/c e C57BL/6. Em animais coinfectados de ambas as linhagens os níveis de IFN- γ no sobrenadante do cultivo de células do baço diminuíram e IL-4 e IL-5 aumentaram. Estas mudanças foram associadas a pneumonia severa e estado debilitado dos animais. No entanto, quando infectados oralmente com 100 cistos do parasito, a infestação pelo ácaro melhorou as lesões intestinais por *T. gondii* em camundongos C57BL/6 e retardou a mortalidade. Estes resultados sugerem que, a resposta imune induzida pelo *M. musculus* interfere na resposta imune Th1 induzida por *T. gondii* e é prejudicial ao hospedeiro, mas por outro lado, esta infestação pode controlar as lesões intestinais graves induzidas pela resposta Th1 excessiva.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, *Myocoptes musculus*, coinfecção, células Th1/Th2.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that induces a Th1 immune response, in both resistant, BALB/c and susceptible, C57BL/6, lineages of mice to this parasite. *Myocoptes musculus* is a mite that induces a Th2 immune response. In this research work was investigated whether chronic infestation with the *M. musculus* influences in the immunopathology and development of *T. gondii*-induced Th1 responses, in BALB/6 and C57BL/6 lineages of mice. The animals were infested with *M. musculus* and one month later were infected via the oral (10 cysts) or intraperitoneal route (100 cysts) with the ME-49 strain of *T. gondii* being survival and immune response monitored. We observed that the mite infestation accelerated mortality by infection with 10 *T. gondii* cysts administered by intraperitoneal route in both BALB/c and C57BL/6 lineage of mice. The splenocytes supernatant IFN- γ decreased and IL-4 and IL-5 elevated in coinfecting mice from both lineages. These changes were associated with severe pneumonia and wasting condition. In contrast. When inoculated orally with 100 cysts of the parasite, the mite infestation ameliorates mortality. The results suggest that the immune response induced by the *M. musculus* interferes in the type-1 immune response induced by *T. gondii* and it is detrimental to the host but on the other hand this infection can control the severe intestinal lesions induced by an excessive Th1 immune response.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Myocoptes musculus*, coinfection, Th1/Th2 cells.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Acariase

A sarna sarcóptica ou escabiose é uma doença de pele contagiosa comum causada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei*. Esta doença afeta indivíduos de todos os níveis sócio-econômicos e se encontra mundialmente distribuída. *S. scabiei* infesta diferentes hospedeiros mamíferos em 17 famílias e 7 ordens, incluindo animais domésticos e humanos (FAIN, 1978).

Ao realizar um estudo comparativo da morfologia de várias variedades de *S. scabiei* de diferentes hospedeiros, Fain (1968, 1978) concluiu que não há uma variação taxonômica significativa entre as variedades de diferentes hospedeiros e propôs que o gênero *Sarcoptes* é formado por uma única espécie, *S. scabiei*. Estudos posteriores indicaram diferenças fisiológicas entre os ácaros da sarna de diferentes hospedeiros uma vez que foi possível transferir experimentalmente ácaros de cães (var. *canis*) para coelhos, mas ácaros de humanos (var. *hominis*) e suínos (var. *suis*) não (ARLIAN et al., 1985; ARLIAN; VYSZENSKI-MOHER; CORDOVA, 1988). Estes estudos inferem ainda que as variedades de *S. scabiei* são hospedeiro específicas pois foi observada uma limitada infectividade cruzada entre as diferentes espécies de hospedeiros. As razões pelas quais as diferentes variedades de ácaros são hospedeiro específicas não são conhecidas ainda, mas podem estar relacionadas com a interação tanto de fatores do hospedeiro como do parasito. Segundo Arlian (1989), estes fatores podem ser: diferenças na alimentação e ambiente requerido pelas diferentes variedades de ácaros, diferenças nas propriedades fisiológicas da epiderme do hospedeiro, antigenecidade do parasito e resistência parasito frente a resposta imune do hospedeiro. Assim, trata-se de uma espécie com variedades de *S. scabiei*, que são designados de acordo com o hospedeiro de procedência: *S. scabiei* var. *hominis*, var. *canis*, var. *cuniculi*, var. *caprae*, var. *ovis*, var. *suis*, var. *bovis* e var. *equi* (MARCONDES, 2001).

Em humanos, encontramos o ácaro *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*, cuja transmissão pode ocorrer por meio de fômites, porém em condições normais, o contato físico é a única via de transmissão de importância epidemiológica (BURGESS, 1994). Crianças, idosos, pacientes com HIV/AIDS e imunocomprometidos são predispostos às infecções (CHOSIDOW, 2000) que podem ser mais graves nestes indivíduos (COMMENS, 1994). O ácaro da sarna localiza-se principalmente nos espaços interdigitais, nos punhos, na face interna dos braços, nas axilas, na região do cotovelo, no ventre, na face interna das coxas, nos órgãos genitais, nas nádegas e nos seios.

A escabiose se caracteriza pelo surgimento de lesões de pele, com alterações eczematosas, prurido intenso e alopecia (MARCONDES, 2001; GUIMARÃES; TUCCI; BATTESTI, 2001). O parasito instala-se na epiderme, sob a camada córnea onde cava túneis. Ao abrir os túneis provoca a exsudação da linfa que, em contato com o ar, forma crostas úmidas, contornadas por áreas de descamação eritematosas (MARCONDES, 2001). A lesão e prurido associados a infestação primária iniciam quatro a oito semanas após o contato. No entanto, no caso de reinfestação subsequente (infestação secundária), estes sinais e sintomas são evidentes dentro de 24-48 horas (MELLANBY, 1944). Trabalhos recentes têm afirmado que em alguns casos, a lesão e prurido associados a infestação primária se desenvolvem em até duas semanas após o contato (PARISH et al, 1983; REILLY, 1984). Condições sócio-econômicas precárias, aglomerações, não emprego de tratamentos tópicos comumente utilizados e o desenvolvimento de resistência medicamentosa são os grandes responsáveis pela manutenção de altas taxas de prevalência, especialmente em populações carentes (HEUKELBACH; OLIVEIRA; FELDMEIER, 2003). Neste meio, a prevalência atinge cerca de 10% (WILCKE et al., 2002).

Em suínos, a infecção pelo *Sarcoptes scabiei* var. *suis* é responsável por uma diminuição da taxa de crescimento, redução da conversão alimentar e fertilidade (ARENDS et al., 1990). Tem sido relatado que uma elevada proporção das fazendas de criação de suínos (70 a 90%) e um grande número de animais presentes nestas (20 a 95%) são acometidos por este ectoparasito (DOBSON; DAVIES, 1992; GUITÉRREZ et al., 1996). Nestes animais, a sarna inicia-se em

áreas do corpo onde o pêlo é mais escasso, como orelhas, focinho, ao redor dos olhos e se espalha destes locais para as outras áreas do (GUIMARÃES; TUCCI; BATTESTI, 2001).

Myobia musculi (SCHRANK, 1781), ácaro encontrado em camundongos e outras espécies de roedores de biotério, têm sido associado a dermatites e alopecia. *Myocoptes musculinus* (KOCH, 1844), o ectoparasito em estudo, infesta camundongos e outras espécies de roedores de biotério causando a sarna miocóptica. Diferente de *S. scabiei*, este ácaro não cava túneis na epiderme (JUNGSMANN et al., 1996) e permanece mais tempo preso aos pêlos do hospedeiro do que sobre a pele (MARCONDES, 2001). A passagem de um hospedeiro para outro ocorre por contato direto entre os animais, sendo rara a infecção através da cama (WEISBROTH, 1982a). Os sintomas provocados por infestações com *M. musculinus* na maioria das vezes não são aparentes, contudo, quando há uma grande quantidade de ácaros os sinais clínicos aparecem. Animais com infestações maciças apresentam queda de pêlo, eritema no pescoço, ombro e dorso, podendo ocorrer prurido e dermatite principalmente na região do abdômen. A presença de grande número de ácaros torna a pelagem acinzentada e sem brilho. A área afetada aumenta progressivamente, o animal perde peso e se torna cada vez mais debilitado. Em alguns casos observa-se hiperqueratose grave e dermatite ulcerativa (JUNGSMANN et al., 1996a). Em um estudo parasitológico realizado para verificar as condições de saúde de 15 colônias de camundongos e 10 colônias de ratos produzidos em 18 biotérios de Instituições Brasileiras que fornecem animais para ensino, pesquisa e produção de imunobiológicos de uso médico ou veterinário, a prevalência de *Myocoptes musculinus* e *Myobia musculi* foi de 46,6 % e 26,6%, respectivamente (GILIOLI et al., 2000).

Atualmente, ácaros que acometem humanos não são cultivados *in vitro*, o que explica os limitados dados disponíveis com antígenos específicos para esse ectoparasito. Como alternativa são utilizados ácaros de animais, visto sua fácil obtenção, ou seja, a partir de coelhos infestados com *S. scabiei* var. *canis* criados em laboratório (ARLIAN; MORGAN, 1994) ou raposas (*Vulpes vulpes*) infestadas com *S. scabiei* var. *vulpes* (SHOFFEL et al., 1991; SHUSTER et al., 2001). Os

extratos antigênicos obtidos destes ácaros são utilizados em testes sorológicos para diagnóstico de sarna uma vez que ocorre reatividade cruzada entre as diferentes variedades de *S. scabiei*.

A presença de ácaros em raspado de pele é um dos métodos empregados para o diagnóstico da sarna. No entanto, é um método de baixa sensibilidade (YEOMAN, 1983; GUITÉRREZ et al., 1996). Ensaio imunoenzimático (ELISA) têm sido empregados para o diagnóstico sorológico da sarna, mostrando sensibilidade e especificidade variadas. Utilizando como antígeno *S. scabiei* var *vulpes*, para diagnóstico de sarna em cães, obteve-se uma sensibilidade e especificidade de 92 e 96%, respectivamente. (BORNSTEIN; THEBO; ZAKRISSON, 1996). Em suínos, utilizando o mesmo antígeno, a sensibilidade e especificidade foi de 87,8 e 99,5%, respectivamente quando o diagnóstico clínico foi usado como “gold standard”. No entanto, uma elevada sensibilidade (100%) mas baixa especificidade (32,8%) foi obtida quando os resultados de raspado de pele foram usados como “gold standard” (BORNSTEIN; WALLGREN, 1997). Já em humanos, obteve-se uma sensibilidade de 48%, mostrando uma baixa reatividade cruzada entre ácaros de humanos e de raposas (HAAS, et al., 2004).

1.2) Morfologia do parasito

Os ácaros adultos causadores da sarna miocóptica apresentam dimorfismo sexual bem evidente. A fêmea apresenta coloração esbranquiçada, formato oval e alongado, medindo cerca de 300 µm de comprimento por 130 µm de largura. O corpo é estriado e ventralmente aparecem projeções diminutas em forma de espinho entre as estriações. A abertura genital é triangular, porém, quando fechada adquire a forma de uma fenda transversal localizada entre o quarto par de pernas. A abertura anal fica na região posterior e ventral, próxima a um par de longas cerdas terminais. O primeiro e segundo pares de pernas possuem seis segmentos, sendo o pretarso curto e pedunculado, portando em sua extremidade distal um aparato que deve ter se originado a partir de cerdas modificadas e que funciona como ventosas ambulacrais. O terceiro e quarto pares de pernas são altamente modificados para a finalidade de agarrar o pêlo do hospedeiro, servindo

como eficientes órgãos de fixação. O macho é mais esclerotizado, menos estriado e menor que a fêmea, medindo cerca de 190 µm de comprimento por 135 µm de largura. Como na fêmea, tem os dois primeiros pares de pernas com pretarsos curtos e o terceiro modificado em órgão de fixação. De forma diferente, o quarto par, é muito aumentado, com cinco segmentos, não apresenta modificação alguma para fixação e termina em projeções semelhantes a garras. A região posterior do idiossoma é bilobada, apresentando duas longas e duas curtas cerdas terminais (COL; CANDELLO, 2003).

1.3) Taxonomia e Ciclo Biológico

Myocoptes musculus pertence ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, coorte Acariformes, ordem Astigmata, família Myocoptidae (MARCONDES, 2001). Até o momento, não existem na literatura relatos da existência de diferentes variedades de *M. musculus*. A mesma classificação é válida para o *S. scabei*, porém este parasito pertence a família Sarcoptidae.

Em seu ciclo vida relativamente curto (10 a 14 dias), *M. musculus*, passa pelas fases de ovo, larva, ninfa e adulto. A fêmea fertilizada efetua a postura dos ovos na base do pêlo. Cada fêmea produz cerca de 200 ovos durante sua vida (oito semanas), depositando de três a quatro ovos por dia. O período de incubação dos ovos dura de três a cinco dias, quando eclodem as larvas que se desenvolvem na superfície da pele. Neste local se alimentam, sofrem mudas (dentro de dois a três dias) originando as ninfas. Estas passam por dois estágios (protoninfa e tritoinfa) e após transformam-se em adultos. O ciclo começa novamente com a fêmea fertilizada efetuando a postura dos ovos (MARCONDES, 2001; GUIMARÃES; TUCCI; BATTESTI, 2001).

1.4) Resposta Imune a *Myocoptes musculus*

Até o momento, poucos trabalhos na literatura abordam a resposta imune induzida por *M. musculus*. Dawson et al., (1986) descreveram a dermatite ulcerativa associada a ácaros (MAUD) em camundongos C57BL/6, sendo esta doença causada por *Myobia musculi* e parece estimular uma intensa resposta alérgica (FLYNN, 1954; WEISBROTH, 1982b; BEAN-KUNDSEN; WAGNER; HALL, 1986). Jungmann et al., (1996a) descreveram uma doença semelhante a MAUD em camundongos da linhagem BALB/c infestados com *M. musculus*. Até então relatos na literatura mostravam que esta linhagem de camundongos era resistente à doença (DAWSON; WHITMORE; BRESNAHAN, 1986). MAUD é caracterizada por lesões de pele eritematosas e pruriginosas, perda do pêlo, linfadenopatia, linfocitopenia, granulocitose e emagrecimento (JUNGSMANN et al., 1996b). Estudos patológicos evidenciaram um intenso infiltrado de células mononucleares, eosinófilos e mastócitos nas lesões cutâneas associado a um elevado nível de IgE sérica. Foi observado também uma redução na concentração de IgM e IgG3, aumento de IgA, IgG1 e IgG2b e níveis normais de IgG2a, quando comparado a animais controle (JUNGSMANN et al., 1996 a).

Em outro estudo, foi verificado que camundongos da linhagem NC/Kuj infestados com *M. musculus* desenvolveram lesões de pele 3-4 semanas após a infestação com o ácaro. Nos estudos patológicos das lesões de pele, foi evidenciado um aumento do número de células mononucleares, neutrófilos, mastócitos e ocasionalmente eosinófilos quando comparado a animais não infestados. Observaram ainda que camundongos infestados produziram elevados níveis de IgE, enquanto que os níveis séricos de IL-4 destes animais permaneceram abaixo do limite de detecção (2 ng/mL). Neste trabalho, foram avaliados também camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados com *M. musculus*. Verificaram que estes camundongos não desenvolveram lesões de pele e o aumento dos níveis de IgE foi mínimo (MORITA et al., 1999).

Jungmann et al., (1996b) avaliaram o perfil imunológico de camundongos BALB/c que apresentavam MAUD devido a infestação por *M. musculus*. Neste trabalho verificaram que os animais afetados pela doença apresentavam hipergamaglobulemia, com aumento de IgG1, IgG2b,

IgA e IgE, e redução no número de células secretoras de IgM e IgG3 no baço. Por meio de bioensaio compararam a produção de citocinas pelas células dos linfonodos de animais doentes e sadios estimuladas com concanavalina A *in vitro*. Os resultados mostraram um aumento em torno de 100 vezes na produção de IL-4 e uma redução de 5 a 10 vezes na produção de IL-2 pelas células dos animais doentes quando comparado com os sadios. Observaram ainda uma redução no número de células pré-B e B na medula óssea e células B no sangue; diminuição de células T nos órgãos linfóides periféricos e sangue dos animais doentes. A partir destes achados concluíram que a infestação por *M. musculus* induz uma resposta do tipo Th2.

1.5) *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose

A primeira descrição de *T. gondii* foi feita em 1908 por Splendore no Brasil, que observou este parasito em um coelho, e por Nicole & Manceaux, que o isolaram de um roedor norte-africano (*Ctenodactylus gondi*). No ano seguinte (1909), Nicole & Manceaux criaram um novo gênero *Toxoplasma*, que incluía a espécie *T. gondii* por eles descrita e *T. cuniculi* descrito por Splendore. Constatou-se, posteriormente, que esses protozoários constituíam uma mesma espécie, identificada pela denominação *T. gondii*.

Toxoplasma gondii é um parasito protozoário obrigatório, cosmopolita e causador da zoonose denominada toxoplasmose. *T. gondii* pode infectar todas as células nucleadas de mamíferos, eritrócitos aviários, eritrócitos imaturos de mamíferos e também culturas primárias de células de peixes e insetos (MINEO; KASPER, 1994). A toxoplasmose é uma doença de importância médica e veterinária, sendo causa de doença congênita e aborto em humanos e animais domésticos (JACKSON; HUTCHISON, 1989).

T. gondii apresenta três estágios infecciosos: os taquizoítas, formas que se multiplicam rapidamente nas células do hospedeiro; os bradizoítas, formas que se multiplicam lentamente dentro dos cistos teciduais; e os esporozoítas, que são as formas encontradas nos esporocistos

contidos dentro dos oocistos liberados nas fezes dos felídeos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

A ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos ou ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais são as duas principais vias de transmissão pós-natal de *Toxoplasma gondii* (DUBEY; BEATTIE, 1988). Segundo Sharma (1990), pode ocorrer também transmissão transplacentária e raramente por transplante de órgão, transfusão ou acidente laboratorial. A fase aguda da doença se caracteriza pela ampla distribuição de *T. gondii* no organismo do hospedeiro, com multiplicação ativa dos taquizoítas no interior de células nucleadas. Na fase crônica, os parasitos permanecem encistados e viáveis, principalmente nos músculos esquelético e cardíaco e no cérebro, nos quais podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro.

A evolução clínica da toxoplasmose adquirida em pacientes imunocompetentes é habitualmente benigna e a infecção é na maioria das vezes assintomática. Os sinais e sintomas mais comuns são linfadenite e febre, acompanhadas por astenia e mialgia (HAKES; ARMSTRONG, 1983). A infecção congênita pode ocorrer quando a mulher é infectada durante a gestação ou por ocasião de reagudização de infecção latente. Quando a transmissão vertical ocorre no primeiro trimestre da gestação, a toxoplasmose pode causar aborto, mortalidade neonatal e anormalidades fetais associadas principalmente com o sistema nervoso central e retina (KASPER; BOOTHROYD, 1993; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Embora as infecções por *T. gondii* sejam geralmente benignas, considerável morbidade e mortalidade pode ocorrer em infecções congênitas e em indivíduos imunocomprometidos, particularmente com câncer (ISRAELSKI; REMINGTON, 1993), transplantados (LUFT; REMINGTON, 1988) ou pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LUFT; REMINGTON, 1992; LUFT et al., 1993a; LUFT et al., 1993b). Neste último grupo de pacientes, a toxoplasmose emergiu a partir da década de 80 como a infecção oportunista mais freqüente e a causa mais comum de lesões cerebrais focais, as quais resultam em encefalite toxoplásmica (LUFT; REMINGTON, 1992).

A toxoplasmose é uma infecção de ampla disseminação entre humanos e animais. A quantidade de inóculo, virulência do parasito, “background” genético do hospedeiro, sexo, e estado imunológico parecem influenciar o curso da infecção em humanos e em modelos de toxoplasmose animal (LIESENFELD, MONTOYA, 2004). Países como Tailândia, Japão e Estados Unidos apresentam baixa soroprevalência (< 20%). Entre os de média soroprevalência estão Austrália (23%), Reino Unido (35%), Polônia (36%) e Bélgica (53%). Taiti (77%) e França apresentam elevada soroprevalência (> 60%) (ZUBER; JAQUIER, 1995; BOYER; REMINGTON; MACLEOD, 1998; COUVERUR; DESMONTS, 1988). A soroprevalência é elevada também nos países da América Latina, incluindo o Brasil, variando de 51 a 72% (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Em diferentes regiões geográficas a taxa anual de soroconversão em gestantes varia de 0.6% a 1.5% (REMINGTON; DESMONTS, 1995; JACQUIER et al., 1995; FOULON et al., 1988).

1.6) Morfologia do parasito

Toxoplasma gondii e outros membros do filo Apicomplexa (*Plasmodium*, *Cryptosporidium* e *Eimeria*) são parasitos que compartilham distintas características morfológicas. Como os demais parasitos do filo Apicomplexa apresentam na extremidade anterior ou apical uma forma pontiaguda (conoïdal) e na extremidade posterior forma arredondada. Compartilham características citológicas com outras células eucarióticas, incluindo mitocôndria, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático e núcleo (CHOBOTAR; SCHOLTYSECK, 1982; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002).

O parasito apresenta formato de arco, com cerca de 2 µm de largura e 6 µm de comprimento. Possuem uma película que é composta de três membranas: plasmalema que é a membrana externa e contínua e o complexo de membrana interna (IMC), formado por duas membranas justapostas e descontínuas, terminando em estruturas chamadas anéis polares que estão localizados na extremidade anterior do parasito. As membranas internas possuem duas

aberturas denominadas microporos que podem estar envolvidas na passagem de nutrientes. Possuem três organelas secretórias morfologicamente distintas: micronemas, roptrias e grânulos densos. As duas primeiras organelas estão localizadas na porção anterior da célula, enquanto os grânulos densos estão distribuídos em todo o citoplasma. Na extremidade anterior se encontra o aparelho apical composto pelo conóide, um cone cilíndrico que consiste de seis a oito elementos microtubulares enrolados como molas comprimidas. O conóide pode girar, inclinar, esticar e retraindo quando o parasita perfura a plasmalema da célula do hospedeiro, antes da penetração. Apresentam ainda 22 microtúbulos subpeliculares que se originam do anel polar anterior e se estendem longitudinalmente por quase toda a extensão do parasito (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Esses microtúbulos são importantes para a forma e a polaridade apical. Quando os microtúbulos subpeliculares são rompidos, a forma e a polaridade apical são perdidas (MORRISSETTE; ROSS, 1998; STOKKERMANS et al., 1996).

Os cistos teciduais variam de tamanho; cistos jovens têm aproximadamente 12 μm (JACKSON; HUTCHISON, 1989), enquanto cistos mais velhos atingem no máximo 70 μm quando se localizam no cérebro e 100 μm quando intramusculares (DUBEY, 1977, 1993). Diversos critérios são utilizados para distinguir taquizoítas de bradizoítas. Taquizoítas têm um núcleo localizado centralmente, poucos ou nenhum grânulo corado pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e são encontrados principalmente na fase aguda da infecção, enquanto bradizoítas têm um núcleo localizado terminalmente, diversos grânulos PAS positivos, estão envolvidos por uma parede cística resistente e são mais prevalentes na fase crônica da infecção (DUBEY; FRENKEL, 1976). Segundo Jacobs; Remington; Melton (1960) os bradizoítas são menos suscetíveis a destruição por enzimas proteolíticas que os taquizoítas.

1.7) Taxonomia e Ciclo Biológico

Toxoplasma gondii pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e gênero *Toxoplasma* (REY, 2001).

O ciclo biológico de *T. gondii* compreende uma fase assexuada que ocorre tanto nos hospedeiros intermediários como nos definitivos, e uma fase sexuada que ocorre somente nos hospedeiros definitivos, os felídeos domésticos e selvagens (FELDMAN, 1982).

O ciclo sexuada inicia quando um membro da família dos felídeos ingere oocistos contendo esporozoítas ou cistos teciduais contendo bradizoítas. Os bradizoítas liberados dos cistos teciduais penetram nas células epiteliais, se diferenciam em taquizoítas e iniciam uma fase assexual de multiplicação por endodiogenia, produzindo micro e macrogametas. A fusão dos gametas produz o zigoto que secreta uma membrana cística rígida e este é eliminado com as fezes como oocisto não esporulado. A esporulação do oocisto ocorre de 1 a 5 dias, dependendo das condições de aeração e temperatura do meio ambiente. Quando oocistos são ingeridos pelos felídeos, os esporozoítas liberados apresentam inicialmente uma fase de multiplicação assexual em tecidos extra-intestinais, sendo que alguns parasitos migram para os tecidos intestinais e iniciam a fase sexual de reprodução (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Felídeos eliminam oocistos de *T. gondii* nas fezes 3 a 10 dias após a ingestão de bradizoítas, cerca de 18 dias após ingestão de oocistos esporulados e em torno de 13 dias após ingestão de taquizoítas. O ciclo induzido no gato pelo bradizoíta é mais eficiente, uma vez que quase todos os animais alimentados com cistos teciduais eliminam oocistos, enquanto menos que 30 % dos gatos alimentados com taquizoítas ou oocistos esporulados eliminam oocistos (DUBEY; FRENKEL, 1976).

Quando um hospedeiro intermediário (provavelmente todos os animais de sangue quente) ingere oocistos contendo esporozoítas ou cistos teciduais contendo bradizoítas, estes invadem o epitélio do intestino delgado, transformando-se em taquizoítas. Os taquizoítas se multiplicam

rapidamente e se disseminam pelo organismo. A resposta imune do hospedeiro limita a multiplicação dos taquizoítas, resultando na formação de cistos, os quais possuem em seu interior bradizoítas que se multiplicam lentamente (KASPER; BOOTHROYD, 1993).

1.8) Resposta Imune a *Toxoplasma gondii*

A infecção por *T. gondii* induz uma imunidade mediada por células, caracterizada por uma resposta do tipo Th1 (GAZZINELLI; DENKERS; SHER, 1993a; GAZZINELLI et al., 1996). No início da infecção, *T. gondii* induz a síntese de IL-12 por macrófagos (GAZZINELLI et al., 1994), neutrófilos (BLISS et al., 1999; BLISS; BUTCHER; DENKERS, 2000) e células dendríticas (REIS E SOUSA et al., 1997). IL-12 por sua vez estimula a produção de IFN- γ por células NK (GAZZINELLI et al., 1993b; HUNTER et al., 1994) e linfócitos T (GAZZINELLI et al., 1994).

IFN- γ é um importante mediador de resistência ao parasito (SUZUKI et al., 1988). A ativação dos macrófagos por IFN- γ resulta na indução do gene da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) e síntese de níveis elevados de radicais intermediários do nitrogênio, principalmente o óxido nítrico (NO) (JAMES, 1995). A produção de radicais intermediários do nitrogênio é um dos mecanismos induzidos por IFN- γ que está envolvido no controle da multiplicação de taquizoítas, uma vez que camundongos tratados com inibidor de iNOS (HAYASHI et al., 1996) ou deficientes em iNOS (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997) são mais susceptíveis a infecção pelo parasito. Por outro lado, animais geneticamente deficientes em IFN- γ (SCHARTON-KERSTEN et al., 1996) e receptor para IFN- γ (DECKERT-SCHLUTER et al., 1996) são altamente susceptíveis à infecção aguda, apresentando 100% de mortalidade até o 10º dia de infecção.

Outro mecanismo induzido por IFN- γ é a indução de radicais intermediários do oxigênio (NATHAN et al., 1983). Demonstrou-se recentemente que este mecanismo está envolvido na inibição da multiplicação de *T. gondii* em células dendríticas de camundongos (ALINE; BOUT;

DIMIER-POISSON, 2002). Um terceiro mecanismo de defesa induzido por IFN- γ é a indução da enzima indoleamina 2,3- dioxigenase (INDO) com conseqüente degradação do triptofano (PFEFFERKORN, 1984), que é um aminoácido essencial necessário para uma variedade de processos metabólicos.

Em um estudo recente, camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* apresentaram uma redução nos níveis de triptofano e aumento na formação da quinurenina no pulmão e soro, com máxima expressão do mRNA da INDO no pulmão 10 a 20 dias após a infecção. No entanto, o mesmo não foi observado em animais geneticamente deficientes em IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) e Fator 1 regulado por IFN- γ (IRF-1 $^{-/-}$). Elevada atividade e indução do mRNA da INDO foram observados nos animais geneticamente deficientes em receptor p55 de TNF (TNFRp55 $^{-/-}$) e INOS (iNOS $^{-/-}$). Estes resultados indicam que a via de degradação do triptofano-quinurenina é ativada de forma dependente de IFN- γ e IRF-1 e pode contribuir no controle do parasitismo no pulmão de animais infectados com *T. gondii* (SILVA et al., 2002).

1.9) *Toxoplasma gondii* frente a coinfecção com organismos infecciosos indutores de resposta imune Th2

O fato de coinfeções serem comuns em nosso meio, têm estimulado pesquisadores a investigar a resposta imune em camundongos infectados simultaneamente com organismos que induzem resposta Th2 (helmintos) e resposta Th1 (patógenos intracelulares).

Marshall et al., (1999) estudaram um modelo de coinfecção com *Schistosoma mansoni* (Th2) e *Toxoplasma gondii* (Th1) em camundongos da linhagem C57BL/6 verificaram que animais cronicamente infectados com *S. mansoni* ou infectados apenas com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* sobreviveram, enquanto 34% dos animais coinfectados morreram. Nestes animais, houve um aumento nos níveis plasmáticos de TNF- α e redução dos níveis de IFN- γ e NO quando comparado aos animais infectados somente por *T. gondii*. A infecção crônica com *S. mansoni* reduziu a patologia intestinal decorrente da infecção por *T. gondii*, mas por outro lado,

aumentou os danos hepáticos. Ao comparar o número de cistos presentes no tecido cerebral verificaram que não houve diferença entre animais infectados somente com *T. gondii* e os coinfectedos. A partir destes resultados concluíram que os elevados níveis sistêmicos de TNF- α medeiam a patologia hepática levando o camundongo coinfectedo a morte.

Em outro estudo de coinfeção, com *Leishmania major* (Th2) e *Toxoplasma gondii* (Th1) utilizando camundongos BALB/c, que são susceptíveis a infecção por *L. major*, foi verificado que animais coinfectedos com *L. major* durante a infecção aguda por *T. gondii* (infecção com 20 cistos da cepa ME-49 5 dias antes da infecção por *L. major*), apresentaram supressão da síntese de IL-4 e IgG1 *Leishmania*-específica, quando comparado aos animais infectados apenas com *L. major*. Em vista destes resultados os autores sugerem que o mecanismo operante durante a toxoplasmose aguda e que é responsável pela proteção contra a imunopatologia induzida por *L. major*, é a inibição da diferenciação de células Th no fenótipo Th2 (SANTIAGO et al., 1999).

Ao estudar a coinfeção com *Nippostrongylus brasiliensis* (Th2) e *Toxoplasma gondii*, foi verificado que animais previamente infectados com *N. brasiliensis* 7 dias após infectados oralmente com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* apresentaram um aumento nos níveis de IL-12 e IFN- γ , redução nos níveis de IL-4 e IL-5 e número de eosinófilos sanguíneos quando comparado com animais infectados com *N. brasiliensis* apenas, e estes animais desenvolveram imunopatologia intestinal e morreram no mesmo período que animais infectados por *T. gondii* apenas. Quando animais foram infectados oralmente com 10 cistos de *T. gondii* duas ou quatro semanas antes da infecção com *N. brasiliensis* houve uma redução nos níveis IL-4 e IL-5 e número de eosinófilos sanguíneos, o que resultou em uma elevada e prolongada eliminação de ovos deste helminto. Estes resultados mostram que a resposta Th2 induzida por *N. brasiliensis* não consegue alterar a imunopatologia e resposta Th1 induzida por *T. gondii*. Por outro lado, a infecção por *T. gondii* suprime a resposta Th2 induzida por *N. brasiliensis*, independente se estabelecida ou em desenvolvimento (LIESENFELD; DUNAY, ERB, 2004).

Camundongos BALB/c quando infectados com *Helicobacter felis* (Th2), produziram níveis elevados de IL-4 e IL-10 pela mucosa gástrica local. No entanto, este perfil Th2 foi revertido

para Th1 quando estes animais foram coinfectados por *T. gondii*, com elevada produção de IL-12 e IFN- γ pela mucosa gástrica associada a inflamação grave. Foi verificado ainda que animais coinfectados atingiram 95% de mortalidade enquanto que em animais infectados apenas por *T. gondii* esta foi de 50 % (STOICOV et al., 2004)

Considerando que a infecção por *T. gondii* induz uma imunidade mediada por células, caracterizada por uma resposta do tipo Th1 e *M. musculinus* induz uma resposta do tipo Th2, o presente estudo busca avaliar se a infestação crônica por *M. musculinus* estaria interferindo no desenvolvimento da resposta Th1 e imunopatologia induzida por *T. gondii* em camundongos susceptíveis, C57BL/6 e resistentes, BALB/c, a este parasito.

2) OBJETIVOS

2.2) Geral

Verificar se a resposta imune induzida por *M. musculus* (Th2) interfere com a resposta ao protozoário *T. gondii* (Th1).

2.1) Específicos

- Avaliar os níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-*T. gondii* produzidos por BALB/c e C57BL/6 previamente infestados ou não por *M. musculus* aos 0, 7, 14, 21 e 30 dias de infecção por *T. gondii* por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).

- Verificar a produção de citocinas aos 0, 7, 14, e 21 dias de infecção por *T. gondii* a no sobrenadante de cultivo de esplenócitos submetidos a diferentes estímulos por meio de ELISA.

- Investigar as alterações patológicas causadas por *T. gondii* no intestino delgado, órgão periféricos e Sistema Nervoso Central por meio de coloração pela Hematoxilina-Eosina e o parasitismo no SNC, por Imunohistoquímica.

- Quantificar o número de eosinófilos circulantes e de mastócitos no intestino delgado de camundongos previamente infestados ou não por *M. musculus* e infectados por *T. gondii*.

- Avaliar a infestação com *M. musculus* a partir da determinação dos níveis de anticorpos IgG anti-*M. musculus* no soro por meio de ELISA.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Animais e organismos infecciosos

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c e C57BL/6 com idade de 8 a 12 semanas as quais foram criadas e mantidas no Centro de Bioterismo do Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia. A cepa de baixa virulência ME-49 de *Toxoplasma gondii* foi utilizada neste experimento. A manutenção da cepa foi feita por inoculação intraperitoneal de camundongos C57BL/6 com 10 cistos de *T. gondii*. Um mês após a inoculação, os cistos cerebrais foram coletados e utilizados para a infecção dos animais. O ectoparasito *Myocoptes musculus* utilizado para infestar os animais foi obtido de camundongos Swiss naturalmente infestados, sendo a sua manutenção feita por infecção experimental de camundongos BALB/c.

3.2) Ensaio de infecção experimental

Para determinar a infecção experimental e a transmissibilidade do parasito *M. musculus*, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infestados com 100 ou 200 ectoparasitos. Para tanto, ectoparasitos foram coletados do pêlo de camundongos Swiss naturalmente infestados e colocados na região dorsal dos camundongos BALB/c e C57BL/6 (5 animais por grupo experimental). Em paralelo, camundongos de ambas as linhagens foram colocados na mesma gaiola que os animais infestados de forma natural com *M. musculus*. Os animais foram acompanhados por um período de 30 dias para avaliar a presença do parasito, o aparecimento dos sinais clínicos iniciais e o desenvolvimento da doença.

3.3) Determinação entomológica do ácaro

Ectoparasitos foram isolados de camundongos BALB/c experimentalmente infestados. Para tanto, o pêlo dos camundongos foi cortado e a pele raspada com o auxílio de uma lâmina de

bisturi (Wiltex, China). O material obtido foi colocado em placas de petri e examinado sob microscópio estereoscópio (Metrimpex, Hungria), sendo os ectoparasitos coletados com a ajuda de agulhas finas e colocados em lâmina contendo 2 gotas de meio de Hoyer (4 mL de água destilada, 3 mL de goma arábica, 20 g de hidrato de cloral e 2 mL de glicerina) (FLECHTMANN, 1986). As lâminas foram montadas com lamínula e deixadas à temperatura ambiente para clarificação do material. A análise das lâminas foi conduzida pela Dra Ana Maria Aparecida Guaraldo do Laboratório de Parasitologia da Universidade de Campinas. O ectoparasito foi determinado como sendo *Myocoptes musculus*.

3.4) Infecção experimental e coleta de material

Os camundongos foram divididos em quatro grupos: infestados apenas com *M. musculus*, infectados apenas por *T. gondii*, infectados com *M. musculus* e *T. gondii* e camundongos sem infestação/infecção. Para infestação com *M. musculus*, os camundongos usados nos experimentos foram mantidos com camundongos BALB/c experimentalmente infestados com o ectoparasito por um período de aproximadamente 30 dias. Para infecção por *T. gondii* os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 10 cistos. Para avaliar o papel da infestação com *M. musculus* na imunopatologia intestinal induzida por *T. gondii*, animais foram infectados oralmente com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Para a análise de mortalidade, dez camundongos por grupo experimental foram acompanhados diariamente. Outros animais foram sacrificados por deslocamento cervical nos dias 0, 7, 14, 21 e 30 após infecção por *T. gondii* sendo realizada a coleta de sangue, órgãos periféricos (fígado, baço, pulmão), Sistema Nervoso Central (SNC) e intestino delgado. A coleta de sangue dos animais foi realizada por meio de punção venosa retro-orbital. O material obtido foi utilizado para a realização de esfregaço sanguíneo e para obtenção do soro, o qual foi armazenado a -20°C até utilização.

Para análise das lesões nos órgãos periféricos e SNC, estes foram fixados em formol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) tamponado a 10% e posteriormente incluídos em paraplast (Oxford®

Labware, St. Louis, MO, EUA). Foram efetuados cortes de 4 µm de espessura (40 µm de distância entre eles) em micrótomo (American Optical modelo Spencer 820, NY, EUA) sendo os cortes destinados para análise de imunohistoquímica fixados em lâminas contendo substância aderente de PVC e os cortes para coloração com Hematoxilina-Eosina (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram fixados em lâminas contendo albumina bovina.

Para análise das lesões patológicas induzidas por *T. gondii* no intestino delgado, este foi coletado, lavado em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) para retirada das fezes, logo após este foi seccionado em 4 partes: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Estes fragmentos foram então enrolados individualmente em um “rolo suíço”. As amostras teciduais obtidas foram fixadas e processadas como descrito anteriormente.

3.5) Contagem de eosinófilos

A quantificação dos eosinófilos foi realizada a partir de esfregaços sanguíneos. Para tanto, aplicou-se uma gota de sangue sobre a lâmina e com o auxílio de uma segunda lâmina o material foi empurrado de modo a se espalhar em camada plana. Após preparo do esfregaço de sangue, este foi seco ao ar e a seguir corado com May Grünwald (Meck, Darmstadt, Alemanha). A lâmina foi coberta com a solução corante por dois minutos e em seguida foi gotejado água destilada sobre esta, até formar uma mistura homogênea. Após cinco minutos, a lâmina foi lavada em água corrente e permaneceu a temperatura ambiente até secar. O esfregaço foi examinado ao microscópio de luz (Olympus Optical CO., LTD, Tóquio Japão) em aumento de 400X sendo contados 100 leucócitos por lâmina, e o número de eosinófilos presente foi quantificado.

3.6) Coloração por Hematoxilina-Eosina

Os cortes teciduais obtidos conforme descrito no item 3.4 foram colocados em xilol (Quimex, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos, reidratados em álcoois (Vetec) de concentrações decrescentes (100, 90, 80 e 70%) durante três minutos em cada condição. Em seguida, as lâminas contendo os cortes foram imersas em hematoxilina de Harris (Vetec) por cinco minutos e após lavadas por 10 minutos em água corrente. A seguir as lâminas foram imersas em eosina (Cetus, Santo Amaro, SP, Brasil), por 4 minutos e lavadas rapidamente em água corrente. Para montar as lâminas, estas foram desidratadas em álcoois (Vetec) de concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%) durante três minutos em cada condição, em seguida permaneceram por 15 minutos em xilol (Quimex). As lâminas foram montadas utilizando-se lamínula e Entellan (Merck).

3.7) Coloração por Azul de Toluidina

Para quantificar os mastócitos presentes no intestino delgado, cortes teciduais obtidos conforme descrito no item 3.4 foram corados como descrito a seguir. Os cortes teciduais foram colocados em xilol (Quimex) durante 30 minutos e reidratados em álcoois (Vetec) de concentrações decrescentes (100, 90, 80 e 70%) durante três minutos em cada condição. Em seguida, as lâminas contendo os cortes foram imersas em tampão fosfato citrato pH 3,0 por cinco minutos. A seguir as lâminas foram imersas em Azul de Toluidina 0,5% em tampão fosfato citrato pH 3,0 por três minutos, seguido de banho rápido no mesmo tampão. As lâminas foram montadas utilizando-se lamínula e Entellan (Merck)

3.8) Reação de imunohistoquímica para observação de *Toxoplasma gondii* no SNC

Para a determinação do parasitismo tecidual total (parasitos livres e encistados) foi realizada a reação de imunohistoquímica em tecido embebido em paraplast (Oxford®) conforme Gosselin et al. (1986) com modificações. Os cortes teciduais foram colocados em xilol (Quimex) e reidratados conforme descrito no item 3.4. Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, CAAL, São Paulo,

Brasil) a 3%. A seguir, as lâminas foram imersas em solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,2 (PBS) durante cinco minutos. Em seguida as lâminas foram imersas em tampão citrato (constituído de 2,1g de ácido cítrico anidro, um litro de água destilada e NaOH 2M até atingir o pH 6,0) e o resgate dos sítios antigênicos foi efetuado em forno microondas (SHARP, Manaus, Brasil) (SHARMA et al, 1990; SHI et al, 1991) na potência máxima (700 watts), realizando-se dois ciclos de cinco minutos e dois ciclos de quatro minutos. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro albumina bovina (BSA, SIGMA Chemical CO., St. Louis, MO, EUA) a 1% durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram incubadas com antisoro primário (antisoro policlonal produzido em coelhos contra a cepa ME-49), overnight a 4°C. Como controle da reação, foi utilizado soro de coelho não imune na mesma diluição do antisoro primário. Após o período de incubação, as lâminas foram imersas em PBS e em seguida incubadas com o antisoro secundário [(γ -globulina de cabra anti-IgG de coelho biotinizada) SIGMA] na diluição de 1:2000 em PBS durante 30 minutos.

A reação foi amplificada com o complexo ABC (ABC Kit PK-4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:200, durante 30 minutos a 37°C. Após este período as lâminas permaneceram imersas em PBS. A reação foi revelada com a solução cromógena composta de 50 mg de DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, SIGMA) diluída em 200 mL de PBS e 160 μ L de peróxido de hidrogênio 30 v/v adicionado no momento do uso. A contra-coloração foi feita em hematoxilina (Vetec) durante 30 segundos à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas permaneceram imersas em água durante 10 minutos. Após finalizar a reação, as lâminas foram desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%) durante três minutos em cada condição, e por 15 minutos em xilol (Quimex). As lâminas foram montadas utilizando-se lamínula e Entellan (Merck).

3.9) Análise Histológica

Para avaliação das lesões patológicas e infiltração de mastócitos no intestino delgado, as seções foram coradas em Hematoxilina e Eosina e Azul de toluidina, respectivamente sendo a análise feita em toda a extensão do intestino delgado (aumento de 400X).

As alterações histopatológicas foram verificadas também no fígado, baço, pulmão e SNC em seções de 4 µm de espessura coradas por Hematoxilina e Eosina. As lesões patológicas induzidas por *T. gondii* foram quantificadas em 40 campos microscópicos por seção tecidual de um hemisfério cerebral e de cada órgão periférico (aumento de 400X). No intestino delgado as lesões inflamatórias foram graduadas em uma escala arbitrária quanto à sua gravidade como sendo, + suave, ++ moderada, +++ grave, ++++ muito grave de acordo com a presença e extensão de infiltrados inflamatórios na lâmina própria e submucosa, alargamento das vilosidades, aumento em sua espessura e início de necrose.

3.10) Preparo do extrato antigênico de *Myocoptes musculus*

M. musculus foi isolado de camundongos BALB/c experimentalmente infestados. Para tanto, o pêlo dos camundongos foi cortado e a pele raspada com o auxílio de lâmina de bisturi (Wiltex, China). O material obtido foi colocado em placas de petri e examinado sob microscópio estereoscópio (Metrimpex) sendo os ectoparasitos (aproximadamente 6.000 ácaros) coletados com a ajuda de agulhas finas e colocados em PBS. O antígeno solúvel de *M. musculus* (SMAg) foi preparado como descrito anteriormente por Kumar et al., (1998), com algumas modificações. Resumidamente, após centrifugação a 2500 x g por 10 minutos a temperatura ambiente o pellet foi ressuspenso em tampão borato 0,1M pH 8,0. Em seguida foi adicionado nitrogênio líquido ao conteúdo sendo o mesmo macerado com a ajuda de um pistilo até adquirir aspecto de pó. Posteriormente foram adicionados os seguintes inibidores de proteases: aprotinina 10 µg/mL (SIGMA); leupeptina 50 µg/mL (SIGMA); benzamidina 1mM (SIGMA) e PMSF 1,6 mM (Phenylmethylsulfonyl fluoride, SIGMA). O material foi centrifugado (Sorval, Du Pont, EUA) a 46.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi concentrado (Eppendorf

Concentrator, Hamburgo, Alemanha) e estocado a -20°C . A concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al, 1951). SMAg foi utilizado para a realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e estimulação de células do baço.

3.11) Determinação dos níveis de anticorpos IgG anti-*Myocoptes musculus*

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG anti-*M. musculus* em soros de camundongos foi padronizado anteriormente neste laboratório, como descrito a seguir. Placas de poliestireno (Corning Costar 3590, Corning incorporated Costar®, Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50 μL do extrato antigênico de *M. musculus* na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6, overnight a 4°C . As placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, SIGMA) a 0,05% (PBS-T). A seguir, foi adicionado PBS-T contendo BSA (SIGMA) a 1% (PBS-T+ BSA) no volume de 200 μL por poço e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavar as placas por 3 vezes com PBS-T, soros a serem testados, em duplicata, no volume de 50 μL , diluído 1:50 em PBS-T+ BSA a 1% foram adicionados aos poços sensibilizados com o antígeno e incubados por 2 horas a 37°C . Após lavar as placas por 6 vezes com PBS-T, foi adicionado o anticorpo biotilado de cabra anti-IgG de camundongo (SIGMA) diluído 1:1000 em PBS-T + BSA a 1%, no volume de 50 μL por poço e incubado por 1 hora a 37°C . Em seguida, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T. Estreptavidina peroxidase (SIGMA) no volume de 50 μL por poço, diluída 1:500 em PBS-T+ BSA a 1% foi adicionada e a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavar as placas por 6 vezes com PBS-T, a reação foi desenvolvida pela adição do substrato enzimático consistindo de solução ABTS, (2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid, SIGMA) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de H_2O_2 (CAAL). A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Mclean, VA, EUA). Em cada placa, soros controle negativos e positivos foram incluídos. O limite de positividade (*cut off*) foi determinado pela média da densidade óptica dos soros controle

negativos acrescida de três desvios padrões. Títulos de anticorpos foram expressos em índice ELISA (IE), de acordo com Turunen et al. (1983) com algumas modificações, como segue: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, onde valores de $IE > 1,0$ foram considerados como resultados positivos.

3.12) Determinação dos níveis de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*.

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soros de camundongos foi realizado conforme descrito por Ferro et al., (2002), com algumas modificações. Em resumo, placas de poliestireno (KARTELL S.P.A., Noviglio, Milão, Itália) foram sensibilizadas com 50 µL do antígeno de *T. gondii* na concentração de 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6, overnight a 4°C. Após lavar as placas por 3 vezes com PBS-T, soros a serem testados em duplicata, no volume de 50 µL, diluído 1:16 em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) (PBS-T-M), foram adicionados aos poços sensibilizados com o antígeno e incubados por 1 hora a 37°C. Após lavar as placas por 6 vezes com PBS-T, foi adicionado o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (HRP, SIGMA) diluído 1:1000 em PBS-T-M, no volume de 50 µL por poço. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T. A reação foi revelada pela adição do substrato enzimático que consistiu de OPD, (1,2 phenyldiamine, Merck, Schuchardt, Alemanha) em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 contendo 0,012% de H₂O₂ (CAAL) e a densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm em leitor de microplacas (Flow Laboratories). Soros controle positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (*cut off*) foi determinado pela média da densidade óptica dos soros controle negativos acrescida de três desvios padrões. Títulos de anticorpos foram expressos em IE, conforme descrito anteriormente.

3.13) Determinação dos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Toxoplasma gondii*.

Para determinar a produção de IgG1 e IgG2a *T. gondii*-específica, placas de poliestireno (KARTELL S.P.A) foram sensibilizadas com 50 µL do antígeno de *T. gondii* na concentração de 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6, overnight a 4°C. Após lavar as placas por 3 vezes com PBS-T, soros a serem testados em duplicata, no volume de 50 µL, diluídos 1:10 em PBS-T-M foram adicionados aos poços sensibilizados com o antígeno e incubados por 1 hora a 37°C. Após lavar as placas por 6 vezes com PBS-T, foi adicionado o anticorpo de coelho anti- IgG1 ou IgG2a de camundongo diluído 1:10 em PBS-T-M, e incubado por 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T. Para a detecção dos anticorpos IgG1 e IgG2 foi adicionado anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (SIGMA) no volume de 50 µL por poço, diluído 1:100 em PBS-T-M e incubado por 1 hora a 37°C. Após lavar as placas por 6 vezes com PBS-T, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático que consistiu de OPD (1,2 phenylendiamine, Merck) em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 contendo 0,012% de H₂O₂ (CAAL). A densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm em leitor de microplacas (Flow Laboratories). Soros controle positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (*cut off*) foi determinado pela média da densidade óptica dos soros controle negativos acrescida de três desvios padrões. Títulos de anticorpos foram expressos em IE, conforme descrito anteriormente.

3.14) Cultivo de células do baço para a produção de citocinas

O baço coletado como citado anteriormente foi divulsionado para a obtenção de células esplênicas totais. As células foram lavadas duas vezes em solução salina balanceada de Hank's (HSSB) por centrifugação (Centrifugador Excelsa, FANEM, São Paulo, Brasil) a 300 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Para a lise das hemáceas, foram adicionados 2 mL de tampão de lise a cada baço, permanecendo a temperatura ambiente por quatro minutos. Foram adicionados mais 5 mL de HBSS à suspensão de células e estas foram lavadas novamente por centrifugação a 300 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após determinar a viabilidade das células pela

contagem diferencial em azul de Tripán (SIGMA) as células foram cultivadas em quadruplicata na concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) acrescido de soro fetal bovino 10% (SFB, Cultilab), L-glutamina 2 mM (GIBCO, Japão) e gentamicina 40 µg/mL (Neo Química, Anápolis, GO, Brasil) em placas para cultivo celular de 96 poços (Corning Glass Works, Corning, NY EUA) e incubadas a 37°C em estufa umidificada (Isotemp, Fisher Scientific, Asheville, NC, EUA) com 5% de CO₂. As células do baço foram cultivadas na presença ou não de concanavalina A [ConA (5 µg/mL), SIGMA], antígeno solúvel de taquizoítas [STAG (5 µg/mL)] ou antígeno de *M. musculus* [SMAG (5 µg/mL)], por 48 e 72 horas. Após este período, o meio de cultura foi coletado, centrifugado (Centrimicro, FANEM) a 2500 x g por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante armazenado a -70°C até a utilização. O sobrenadante obtido do cultivo celular de 48 horas foi utilizado para dosagem de TNF-α, IL-4, IL-5 e IL-10 e o sobrenadante obtido do cultivo celular de 72 horas foi usado para dosagem de IL-12 e IFN-γ.

3.15) Dosagem de citocinas

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para quantificar as citocinas presentes no sobrenadante do cultivo celular obtido conforme descrito no item 3.14. Resumidamente, microplacas de alta afinidade (Corning incorporated Costar®) foram sensibilizadas (50 µL/poço) com anticorpos policlonais de coelho anti-IL-4, IL-12, TNF-α e IFN-γ murino (Peprotech Mexico, Veracruz, México) na concentração de 1 µg/mL, diluído em PBS e permaneceram por 18 horas à temperatura ambiente. Após lavar as placas por 4 vezes com PBS-T foi adicionado (200 µL/poço) PBS-T + BSA 0,1% aos poços e as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavar as placas por 4 vezes com PBS-T, as amostras foram adicionadas em duplicata, no volume de 50 µL e as placas incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Em paralelo, foi realizada uma curva padrão para cada citocina utilizando padrões [citocinas recombinantes murinas (Peprotech)] em diluições duplas seriadas (50 µL/poço) a partir, 10 até 0,01 ng/mL para IL-4 e IL-12, 100 até 0,098 ng/mL para TNF-α e IFN-γ; diluído em

PBS-T + BSA a 0,1 %. Após lavar as placas por 4 vezes com PBS-T, foi adicionado (50 µL/poço) o anticorpo policlonal de coelho anti-IL-4, IL-12, TNF- α e IFN- γ murino biotilado (Peprotech) na concentração de 0,5 µg/mL diluído em PBS-T + BSA a 0,1% e as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas por 4 vezes com PBS-T. Estreptavidina peroxidase (SIGMA) no volume de 50 µL/poço diluída 1:1000 em PBS-T+ BSA a 0,1% foi adicionada e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavar as placas por 4 vezes com PBS-T, a reação foi desenvolvida pela adição do substrato enzimático que consistiu de solução de ABTS [2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid (SIGMA)] a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂ (CAAL). A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de microplacas (Flow Laboratories). A concentração da citocinas foi determinada comparando-se os valores de DO das amostras com os valores conhecidos obtidos através da curva padrão. O limite de sensibilidade foi de 0,31 ng/mL para IL-12 e 0,4 ng/mL para IFN- γ . Para valores abaixo do limite de sensibilidade, foi considerado o menor ponto da curva padrão. Nova dosagem de IL-4 assim como IL-5 e IL-10 foi realizada utilizando o Kit da Pharmingen (Pharmingen, San Diego, CA, EUA) com a colaboração da Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira e Dr^a. Elaine Vicente Lourenço do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Para cada citocina foi realizada uma curva padrão utilizando padrões a partir de 500 até 7,8 pg/mL para IL-4, 1000 até 15,62 pg/mL para IL-5, 2000 até 31,25 pg/mL para IL-10. O limite de sensibilidade foi de 62,5 pg/mL para IL-4, 125 pg/mL para IL-5 e 62,5 pg/mL para IL-10.

3.16) Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados os programas computadorizados específicos (Microsoft® Excel 2000; GraphPad Prism versão 3.0 e 4.0– GraphPad Software, Inc). Os dados de mortalidade dos grupos experimentais foram analisados pela teste Quiquadrado (X^2). Os dados obtidos da quantificação de parasitos, contagem de eosinófilos e mastócitos foram analisados pelo teste *t* de Student's bicaudal: duas amostras presumindo variâncias equivalentes. A cinética da produção de citocinas, IgG, IgG1 e IgG2a foi analisada por ANOVA e o teste *t* de Student's bicaudal foi utilizado para analisar a diferença entre dois grupos. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4) RESULTADOS

4.1-Infecção experimental de camundongos BALB/c e C57BL/c com *Myocoptes musculus*

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados com 100 ou 200 ectoparasitos foram acompanhados diariamente para avaliar o aparecimento dos sinais clínicos iniciais e o desenvolvimento da doença (sarna miocóptica). Em paralelo, camundongos de ambas as linhagens foram colocados na mesma gaiola que os camundongos Swiss naturalmente infestados com *M. musculus* para avaliar a infecção experimental e a transmissibilidade do ectoparasito.

Observou-se que camundongos BALB/c (Figura 1 C, D) e C57BL/6 (Figura 1 G, H) infestados com 200 ectoparasitos e aqueles que foram mantidos na mesma gaiola que os infestados naturalmente apresentaram prurido intenso, queda de pêlo (principalmente na região do abdômen), pêlo arrepiado, e redução no ganho de peso (Tabela 1) quando comparados aos camundongos BALB/c (Figura 1 A, B) e C57BL/6 (Figura 1 E, F) sem infestação. Estes sintomas foram mais pronunciados nos camundongos da linhagem BALB/c.

Com o intuito de demonstrar a presença do ectoparasito, e em vista do ectoparasito encontrar-se preso aos pêlos, estes foram cortados e a pele raspada com o auxílio de uma lâmina de bisturi. O material obtido foi colocado em placas de petri e examinado sob microscópio estereoscópio. Foi verificada a presença do *M. musculus* em 40% dos animais infestados com 100 ectoparasitos e em 100% dos animais infestados com 200 ectoparasitos bem como naqueles mantidos na mesma gaiola que os infestados de forma natural (dados não mostrados). Uma vez que os animais que foram mantidos na mesma gaiola que os infestados naturalmente desenvolveram sarna miocóptica da mesma forma que os infestados com 200 ectoparasitos, decidiu-se que para infecção dos camundongos a serem utilizados nos experimentos, estes permaneceriam na mesma gaiola que os animais naturalmente infestados e que o número de ectoparasitos necessário para uma infestação eficaz foi de 200 por camundongo. O prazo para

infestação prévia com *M. musculus* foi estipulado como sendo de 30 dias em vista do aparecimento de sinais visíveis da sarna miocóptica.

Tabela 1- Peso corporal de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não com *M. musculus*.

Linhagem do Camundongo	Peso Corporal ^a (g)	
	Controle	Infestado com <i>M. musculus</i>
BALB/c	24,1±1.2	19.7±1,3***
C7BL/6	20,7±0.7	17,7±1,5*

^a Os resultados são a média e o desvio padrão do peso corporal de seis animais por grupo experimental.

***, P<0,001 quando comparado controle.

*, P<0,05 quando comparado com o animal controle.

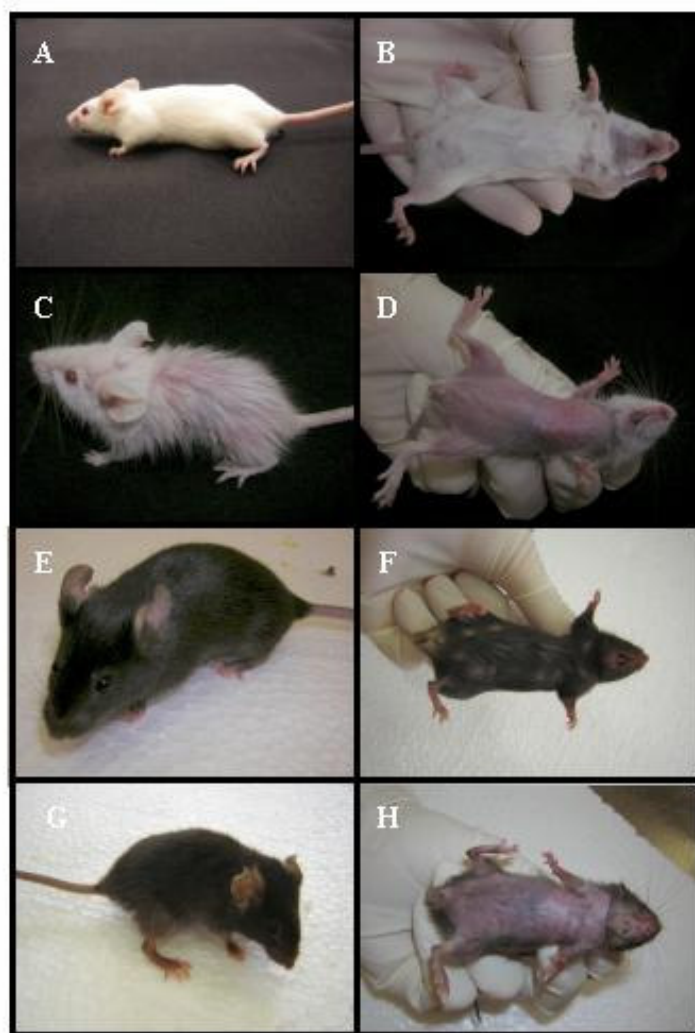


Figura 1. Características da sarna miocóptica. Fotografias A-B e E-F são respectivamente, camundongos BALB/c e C57BL/6 não infestados. Fotografias C-D e G-H são respctivamente, camundongos BAB/c e C57BL/6 infestados com *Myocoptes musculus* por um período de 30 dias.

4.2- Mortalidade de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intraperitoneal com 10 cistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* foram infectados ou não com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e a mortalidade acompanhada diariamente por um período de 70 dias conforme demonstrado na Figura 2.

Foi verificado que quando os animais de ambas as linhagens foram infestados com *M. musculus* estes sobreviveram durante todo o período acompanhado (dados não mostrados). Apesar da mortalidade (30%) de camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* ser maior que a de BALB/c (0%) não houve diferença estatística entre os dois grupos durante o período de observação ($p=0,08$) (Figura 2).

Quando camundongos BALB/c são infestados com *M. musculus* e infectados por *T. gondii* estes começam a morrer a partir do 11º dia após infecção sendo que os não infestados com *M. musculus*, mas infectados por *T. gondii* mantiveram-se vivos por todo o período observado ($p=0,001$) (Figura 2). Os camundongos C57BL/6 submetidos às mesmas condições também morreram a partir do 11º dia atingindo 100% de mortalidade aos 46 dias após infecção, período em que se observa que a mortalidade de camundongos da mesma linhagem não infestados com *M. musculus* e infectados por *T. gondii* atingem apenas 20% ($p<0,0001$) (Figura 2). A partir destes dados conclui-se que animais de ambas as linhagens se tornam mais susceptíveis a infecção por *T. gondii* quando são infestados previamente com *M. musculus*.

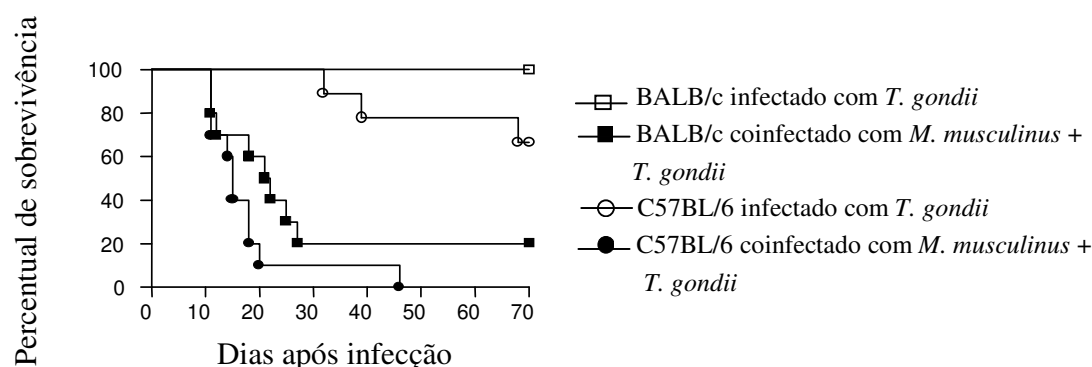


Figura 2. Susceptibilidade de camundongos BALB/c e C57BL/6 previamente infestados com *M. musculus* à infecção por *T. gondii*. Camundongos infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* foram infectados ou não com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e a mortalidade acompanhada diariamente por um período de 70 dias. Os resultados são representativos de 10 animais por grupo experimental.

4.3- Níveis de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*

A comparação dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* [expressos em índice ELISA (IE)] de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e posteriormente infectados ou não com *T. gondii* está demonstrada na Figura 3.

Observa-se que tanto camundongos BALB/c coinfetados como os infectados apenas por *T. gondii* soroconvertem no 14º dia após infecção por *T. gondii*, sendo que os animais infectados por *T. gondii* apresentam maiores níveis de IgG no 21º dia após infecção quando comparado aos animais coinfetados ($P < 0,05$) (Figura 3, painel A). No entanto, no 30º dia após infecção estes níveis são equivalentes nos dois grupos estudados (Figura 3, painel A). Camundongos C57BL/6 coinfetados com *M. musculus* e *T. gondii* soroconvertem no 21º dia após infecção, enquanto animais infectados somente por *T. gondii* permanecem negativos ($p < 0,05$) (Figura 3, painel B). Quando camundongos C57BL/6 são infectados por *T. gondii* ocorre a soroconversão no 30º dia após infecção mas os níveis de anticorpos permanecem inferiores aos produzidos pelos camundongos coinfetados ($P < 0,05$) (Figura 3, painel B).

Ao comparar níveis de IgG anti-*T. gondii* de animais de ambas as linhagens infectados por *T. gondii* verifica-se que a soroconversão em camundongos BALB/c ocorre no 14º dia ($P<0,0001$) após a infecção enquanto que em camundongos C57BL/6 esta acontece somente no 30º dia após infecção com níveis de anticorpos inferiores aos produzidos pelos camundongos BALB/c ($P<0,05$) (Figura 3, painel C).

Quando níveis de IgG anti-*T. gondii* de camundongos coinfetados de ambas as linhagens são comparados, observa-se que a soroconversão em camundongos BALB/c ocorre no 14º dia após infecção e em camundongos C57BL/6 esta ocorre somente no 21º dia após infecção ($P<0,05$) (Figura 3 painel D). Já no 30º dia após infecção os níveis de anticorpos IgG são semelhantes nas duas linhagens estudadas (Figura 3, painel D).

Estes resultados mostram que nos camundongos BALB/c infectados por *T. gondii* e também nos coinfetados a soroconversão inicia antes do que nos animais C57BL/6. No entanto, no 30º dia após infecção por *T. gondii* se observa que ambas as linhagens, quando coinfetadas, produzem níveis semelhantes de anticorpos específicos, enquanto que nos animais infectados somente por *T. gondii* os níveis de anticorpos se mantêm mais elevados nos camundongos BALB/c, inclusive no 30º dia após infecção.

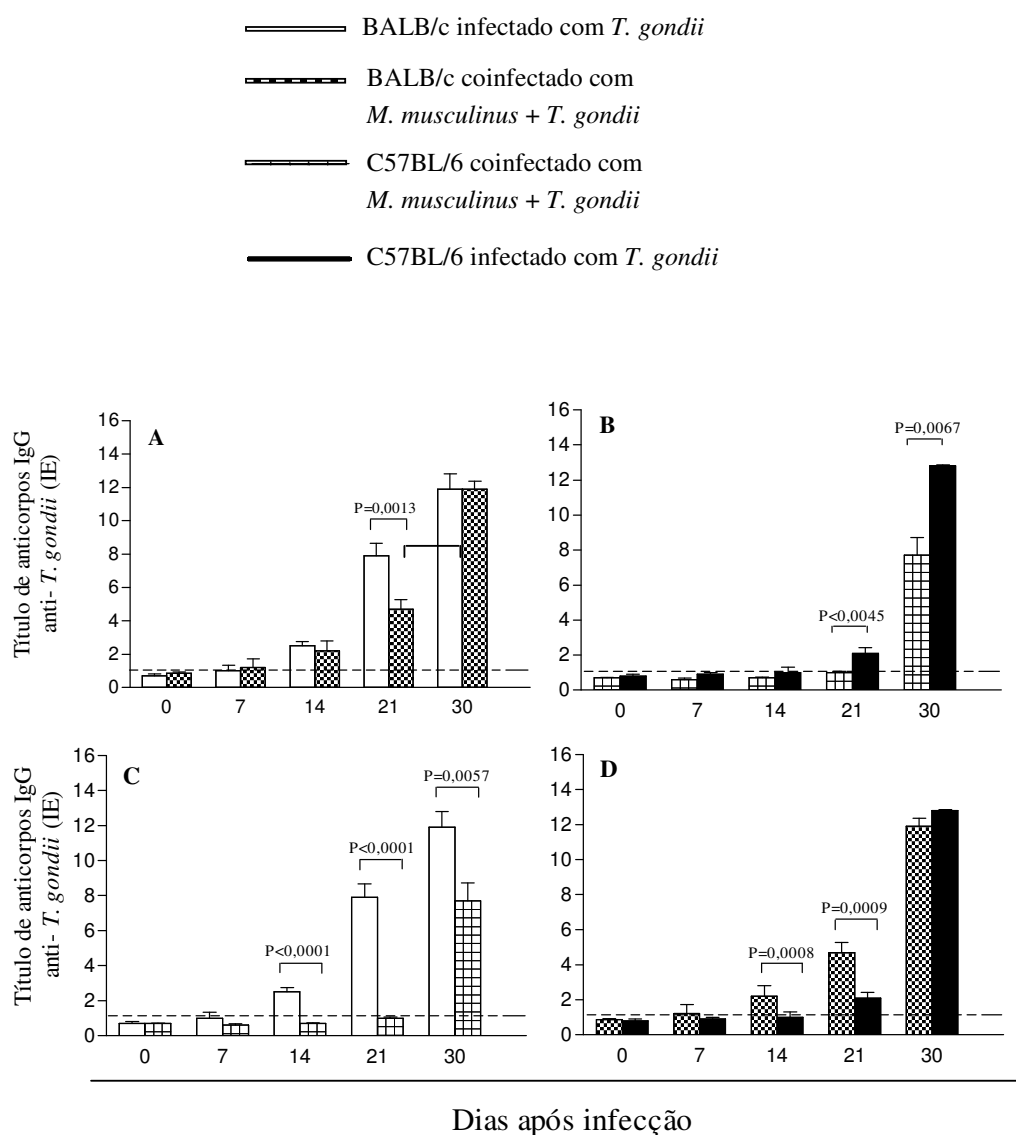


Figura 3. Comparação dos níveis séricos de IgG total anti-*T. gondii*, avaliados por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Títulos de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE), onde valores de IE > 1,0 (linha tracejada) são considerados como resultados positivos. Os resultados (expressos como média $\pm$ desvio padrão) são representativos de quatro animais por grupo experimental.

4.4- Níveis de anticorpos IgG1 anti-*Toxoplasma gondii*

A Figura 4 mostra os níveis de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* [expressos em índice ELISA (IE)] de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e posteriormente infectados ou não por *T. gondii*.

Ao comparar camundongos BALB/c infectados por *T. gondii* com os coinfetados observa-se que a soroconversão em ambos ocorre no 30º dia após infecção, sendo que os animais infectados por *T. gondii* apresentam níveis superiores de anticorpos que os coinfetados ($P<0,05$) (Figura 4, painel A). Quando camundongos C57BL/6 são submetidos às mesmas condições, observa-se que a soroconversão ocorre no 30º dia após infecção, mas somente nos animais infectados por *T. gondii* (Figura 4, painel B).

Quando níveis de IgG1 de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por *T. gondii* são comparados, verifica-se que em ambos a soroconversão ocorre no 30º dia após a infecção, com camundongos BALB/c produzindo níveis mais elevados de anticorpos do que os encontrados nos camundongos C57BL/6 ($P<0,05$) (Figura 4, painel C).

Quando níveis de IgG1 anti-*T. gondii* de camundongos coinfetados de ambas as linhagens são comparados, observa-se que a soroconversão ocorre no 30º dia após infecção mas somente em camundongos BALB/c ($P<0,05$) (Figura 4, painel D).

Conclui-se que os níveis de anticorpos IgG1 são mais elevados em camundongos BALB/c coinfetados e nos infectados somente por *T. gondii* quando comparado com animais C57BL/6 submetidos às mesmas condições.

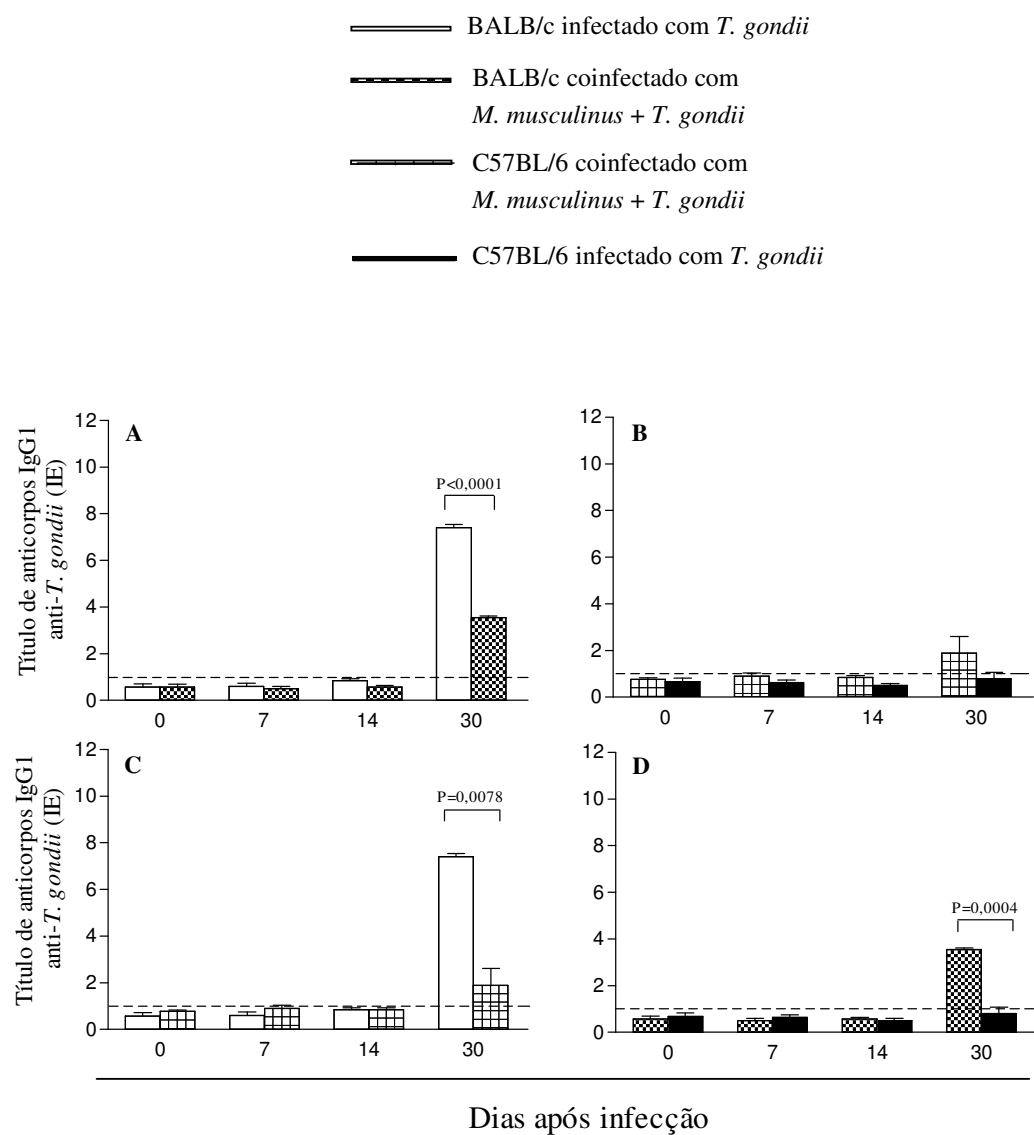


Figura 4. Comparação dos níveis séricos de IgG1 *T.gondii* específicos avaliados por de meio ensaio imunoenzimático (ELISA). Títulos de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE), onde valores de IE > 1,0 (linha tracejada) são considerados como resultados positivos. Os resultados (expressos como média $\pm$ desvio padrão) são representativos de quatro animais por grupo experimental.

4.5- Níveis de anticorpos IgG2a anti-*Toxoplasma gondii*

A Figura 5 mostra os níveis anticorpos IgG2a anti-*T. gondii* [expressos em índice ELISA (IE)] de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e posteriormente infectados ou não por *T. gondii*.

Observa-se que tanto camundongos BALB/c coinfectados como os infectados apenas por *T. gondii* apresentam níveis elevados de IgG2a no 14º dia após infecção por *T. gondii*, sendo que os animais infectados por *T. gondii* apresentam níveis mais elevados de IgG2a no 30º dia após infecção quando comparado aos animais coinfectados ($P<0,05$) (Figura 5, painel A). Camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* soroconvertem no 14º dia após infecção, enquanto que em animais coinfectados com *M. musculus* e *T. gondii* esta soroconversão ocorre no 30º dia, período em que se observa níveis de anticorpos mais elevados nos camundongos infectados por *T. gondii*, embora sem diferença estatística significativa nos dois grupos estudados (Figura 5, painel B).

Ao comparar níveis de IgG2a anti-*T. gondii* em animais infectados por *T. gondii* verifica-se que em ambas as linhagens a soroconversão ocorre no 14º dia após a infecção, com camundongos BALB/c produzindo níveis mais elevados de anticorpos, sendo que no 30º dia após infecção estes níveis são significativamente diferentes dos encontrados nos camundongos C57BL/6 ($P<0,05$) (Figura 5, painel C).

Quando níveis de IgG2a anti-*T. gondii* em camundongos coinfectados de ambas as linhagens são comparados, observa-se que a soroconversão em camundongos BALB/c ocorre no 14º dia após infecção e em camundongos C57BL/6 esta ocorre somente no 30º dia após infecção, com níveis de anticorpos muito inferiores aos encontrados nos camundongos BALB/c no mesmo período avaliado ($P<0,05$) (Figura 5, painel D).

Conclui-se a partir destes dados que camundongos BALB/c infectados somente por *T. gondii* e coinfectados produzem níveis detectáveis de anticorpos IgG2a a partir do 14º após infecção, sendo estes mais elevados que os encontrados em animais C57BL/6 submetidos às mesmas condições.

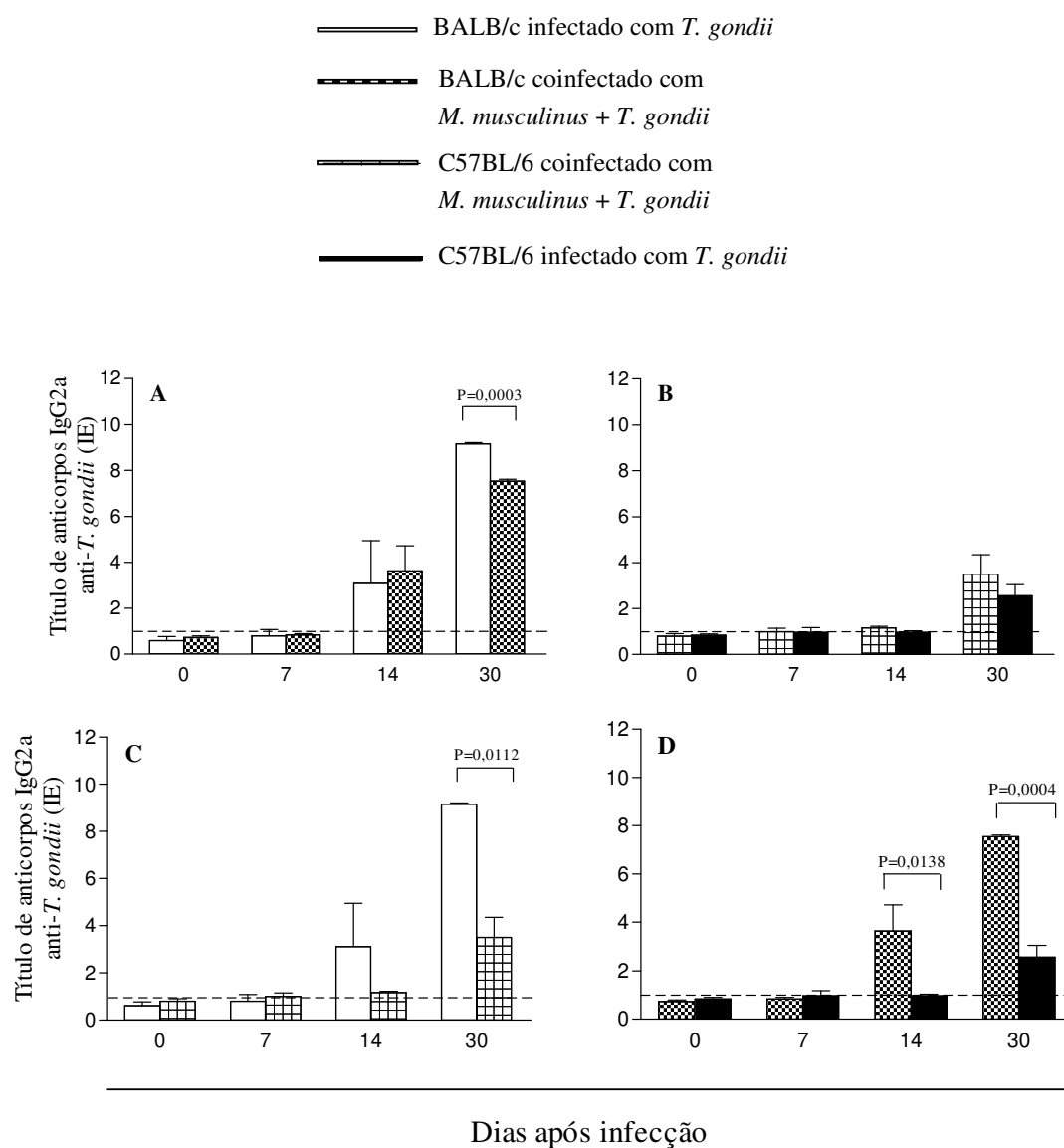


Figura 5. Comparação dos níveis séricos de IgG2a *T.gondii* específicos avaliados por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Títulos de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE), onde valores de IE > 1,0 (linha tracejada) são considerados como resultados positivos. Os resultados (expressos como média $\pm$ desvio padrão) são representativos de quatro animais por grupo experimental.

4.6- Níveis de anticorpos IgG anti-*Myocoptes musculus*

A comparação dos níveis de anticorpos IgG anti-*M. musculus* [expressos em índice ELISA (IE)] de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e posteriormente infectados ou não por *T. gondii* está demonstrada na Figura 6.

Foi observado que os níveis de IgG anti-*M. musculus* em camundongos BALB/c coinfestados com *M. musculus* e *T. gondii* mantiveram-se constantes no decorrer da infecção por *T. gondii* não havendo diferença estatística entre o grupo infestado somente com *M. musculus* (dia 0) e os grupos coinfestados nos diferentes períodos avaliados (Figura 6, painel A). Mas quando se analisa os níveis de IgG anti-*M. musculus* de camundongos C57BL/6 coinfestados com *M. musculus* e *T. gondii* verifica-se que estes diminuem gradualmente no decorrer da infecção por *T. gondii* em relação ao grupo infestado somente com *M. musculus* (dia 0), chegando a negativar a partir do 21º dia após infecção ($P < 0,05$) (Figura 6, painel B).

Quando se compara os níveis de IgG anti-*M. musculus* de ambas as linhagens verifica-se que os camundongos BALB/c apresentam níveis de anticorpos mais elevados que C57BL/6 em todos os tempos avaliados ($P < 0,05$) (Figura 6, painel C).

A partir destes dados conclui-se que 30 dias após a infestação com *M. musculus* anticorpos específicos foram detectados em todos os animais infestados, tanto da linhagem BALB/c como C57BL/c. Porém, ao analisar a cinética da resposta humoral, verifica-se que camundongos BALB/c produziram níveis mais elevados de anticorpos que os camundongos C57BL/6 e estes permaneceram constantes durante o curso da infecção por *T. gondii*, enquanto que em animais C57BL/6 os níveis de anticorpos foram declinando no decorrer da infecção, o que implicou em níveis de anticorpos não detectáveis a partir do 21º dia após infecção por *T. gondii*.

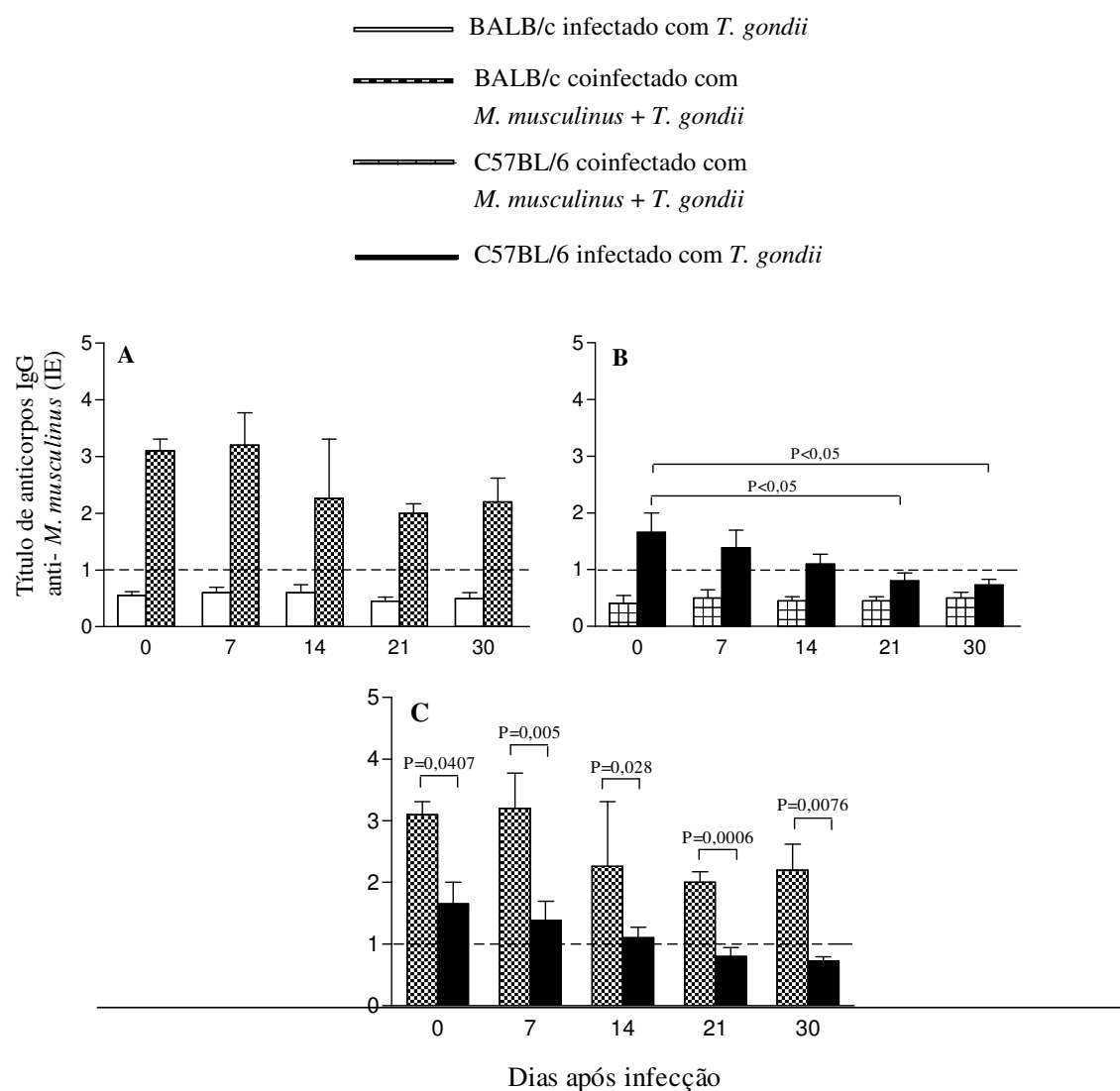


Figura 6. Comparação dos níveis séricos de IgG anti- *M. musculus* avaliados por meio ensaio imunoenzimático (ELISA). Títulos de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE), onde valores de IE > 1,0 (linha tracejada) são considerados como resultados positivos. Os resultados (expressos como média $\pm$ desvio padrão) são representativos de quatro animais por grupo experimental.

4.7- Quantificação de eosinófilos no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57BL/6

Por meio de esfregaço sanguíneo, eosinófilos do sangue periférico dos camundongos BALB/c e C57BL/6 foram quantificados como demonstrado na Figura 7.

Quando se compara o número de eosinófilos dos camundongos BALB/c (Figura 7, painel A) e C57BL/6 (Figura 7, painel B) sem nenhuma infecção (dia 0) com os valores dos animais infestados com *M. musculus* (dia 0 de infecção por *T. gondii*) verificamos que houve uma diferença estatística significativa ($P < 0,0001$; $P = 0,004$, respectivamente) entre estes dois grupos experimentais. No entanto, ao comparar animais infectados por *T. gondii* com animais coinfectados de ambas as linhagens no decorrer da infecção por *T. gondii* (7, 14 e 21 dias após infecção) verificou-se que não houve diferença estatística significativa no número de eosinófilos (Figura 7, painel A e B).

Foi verificado que o número de eosinófilos dos camundongos infestados com *M. musculus* (dia 0 de infecção por *T. gondii*) diminui no decorrer da infecção por *T. gondii* (dia 7, 14 e 21) tanto na linhagem BALB/c (Figura 7, painel A) como na C57BL/6 (Figura 7, painel B) ($p < 0,05$). Estes resultados nos mostram que o número de eosinófilos dos animais de ambas as linhagens infestados com *M. musculus* é maior que o encontrado em animais sem nenhuma infecção/infestação, mas quando estes animais são coinfectados há uma redução no número de eosinófilos e esta se mantém constante no decorrer da infecção por *T. gondii*.

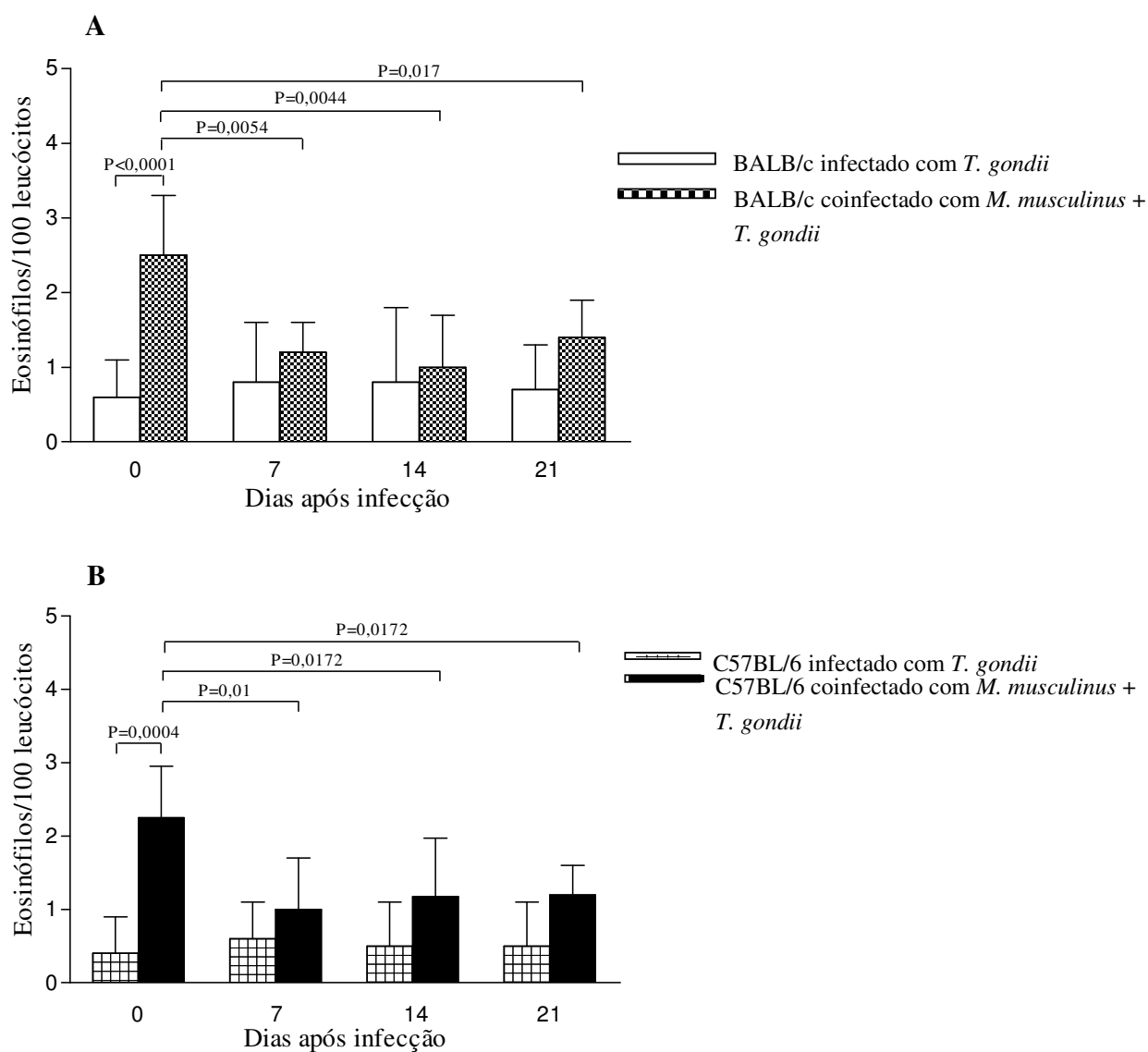


Figura 7. Quantificação de eosinófilos em esfregaço sanguíneo de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) corado com May Grünwald. O esfregaço foi examinado sob microscópio de luz em aumento de 400X sendo contados 100 leucócitos por lâmina, e o número de eosinófilos presente foi quantificado. Os resultados (expressos como média $\pm$ desvio padrão) são representativos de quatro animais por grupo experimental.

4.8-Cinética da secreção das citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10 por células do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 cultivados na presença de diferentes estímulos

Para comparar a resposta imune de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por *T. gondii* e coinfectados com *M. musculus* e *T.gondii*, células do baço foram coletados nos dias 0, 7, 14 e 21 após infecção por *T. gondii* e as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α dosadas no sobrenadante do cultivo celular após 48 ou 72 horas de estimulação com concanavalina A [ConA (5 μ g/mL)], antígeno solúvel de taquizoíta [STAg (5 μ g/mL)], antígeno de *M. musculus* [SMAG (5 μ g/mL)] ou sem estímulo (meio).

TNF- α não foi detectado no sobrenadante de cultivo celular submetido a diferentes estímulos por 48 horas em nenhum dos grupos de ambas as linhagens de camundongos. Quando células do baço foram cultivados na presença de SMAG, não foi detectada a produção de nenhuma das citocinas dosadas nos diferentes grupos de ambas as linhagens de camundongos (dados não mostrados). Os níveis de IL-12 produzidos por células do baço cultivados sem estímulo (meio) foram mais elevados no 7º dia após infecção por *T. gondii* quando comparados aos produzidos nos dias 0, 14 e 21, tanto da linhagem BALB/c (Figura 8, painel A) como da C57BL/6 (Figura 8, painel B) independente dos animais estarem coinfectados ou infectados somente por *T. gondii*. No entanto, não houve diferença estatística quando estes níveis foram comparados com os obtidos pelo mesmo grupo nos dias 0, 14 e 21 após infecção, nem quando se compara o grupo infectado por *T. gondii* com o coinfectado da mesma linhagem e ainda quando se compara o grupo infectado por *T. gondii* com o coinfectado da mesma linhagem entre as linhagens o grupo infectados por *T. gondii* com os coinfectados. Quando os células do baço foram estimulados pela ConA, a produção de IL-12 foi semelhante a observada em cultivo celular sem estímulo (meio) tanto para a linhagem BALB/c (Figura 8, painel C) como para a C57BL/6 (Figura 8, painel D), com diferença estatística observada apenas entre os níveis produzidos no 7º dia após infecção por animais BALB/c coinfectados quando comparado ao valores do dia 0 de infecção (Figura 8, painel C) (a, $P < 0,05$). Na presença de STAg, a produção de IL-12 por células do baço de camundongos BALB/c infectados por *T. gondii* foi aumentando gradualmente até o

14° dia após infecção, e a partir de então se percebe uma tendência de queda na produção. Porém este aumento na produção de IL-12 induzido pela infecção por *T. gondii* não foi significativamente diferente da observada nos animais sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*), os quais produziram níveis elevados de IL-12 quando estimulados pelo STAg (Figura 8, painel E). No entanto, esta concentração de IL-12 presente no 14° dia após infecção, foi maior que a encontrada em animais coinfectados no mesmo período (Figura 8, painel E) (*, $P < 0,05$). Animais infestados apenas com *M. musculus* (dia 0) produziram níveis de IL-12 pouco superiores aos animais sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*), porém sem diferença estatística. No 14° dia após a infecção por *T. gondii*, houve uma redução acentuada da concentração de IL-12, em relação ao 7° e 21° dia após infecção (Figura 8, painel E) (c, $P < 0,05$) mas a partir de então esta concentração aumentou gradualmente atingindo o pico de produção no 21° dia, sendo superior ao verificado nos animais infectados por *T. gondii*, mas sem diferença estatística, porém com diferença em relação ao animal infestado com *M. musculus* (dia 0) (Figura 8 painel E) (a, $P < 0,05$). Em camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* a produção de IL-12 por células do baço estimulados com STAg aumentou gradualmente até o 21° dia após infecção, mas estatisticamente diferente dos níveis produzidos por animais sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*) (Figura 8, painel F) (b, $P < 0,005$). Nos animais coinfectados, *T. gondii* induziu a produção de níveis elevados de IL-12 no 7° dia após infecção, sendo estes maiores que os produzidos por animais infestados apenas com *M. musculus* (dia 0) (Figura 8, painel F) (a, $P < 0,005$) e os encontrados no grupo infectado apenas por *T. gondii* com o mesmo tempo de infecção (Figura 8 painel F) (◆, $P < 0,05$). No 14° dia após infecção, o grupo coinfectado apresentou um comportamento semelhante ao observado na linhagem BALB/, ou seja, uma acentuada redução da concentração de IL-12, mas esta não foi estatisticamente diferente se comparado ao grupo infectado apenas por *T. gondii*, porém foi inferior aos valores produzidos após 7 e 21 dias de infecção (Figura 8, painel F) (c, $P < 0,05$).

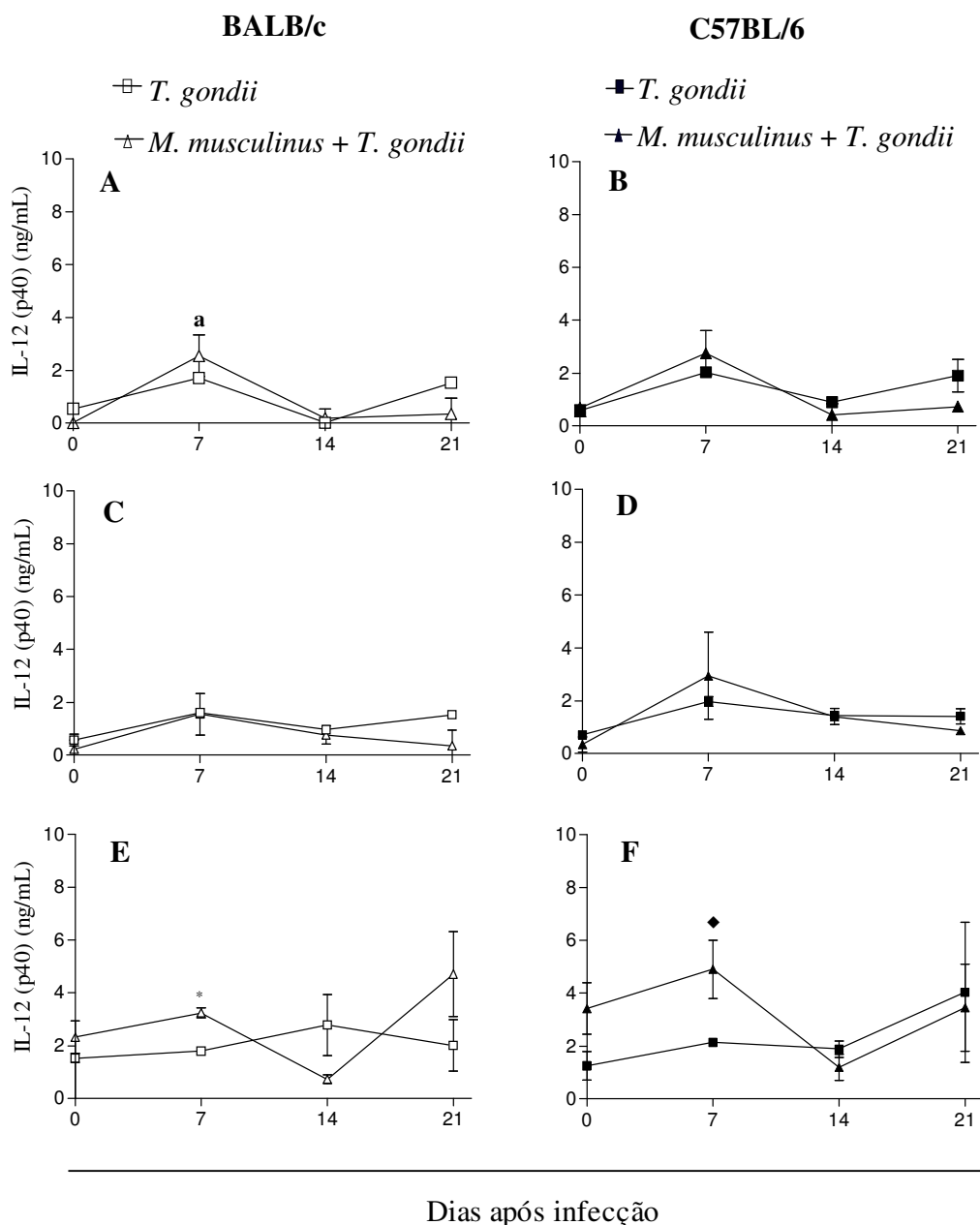


Figura 8. Comparação dos níveis de IL-12 (p40) detectados em sobrenadantes de cultura de células do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e infectados ou não com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Células esplênicas foram coletadas no dia 0, 7, 14 e 21 após infecção e cultivadas sem estímulo (meio) (Figuras A e B), na presença de concanavalina A [ConA (5 µg/mL)] (Figuras C e D) ou antígeno solúvel de taquizoítas [STAg (5 µg/mL)] (Figuras E e F). O sobrenadante foi coletado 72 horas após para avaliar os níveis de IL-12 (p40) por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). As barras representam o desvio padrão.

a, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo infestado apenas por *M. musculus* (dia 0).

b, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo sem nenhuma infecção (dia 0).

c, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo coinfestado com 14 dias de infecção por *T. gondii*.

*****, $P < 0,05$ quando comparado com o camundongo da mesma linhagem coinfestado.

♦, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo C57BL/6 infectado por *T. gondii*.

Os níveis de IFN- γ produzidos por células do baço cultivados sem estímulo (meio) foram mais elevados no 7º dia após infecção por *T. gondii* quando comparados aos produzidos nos dias 0, 14 e 21, tanto da linhagem BALB/c (Figura 9, painel A) como C57BL/6 (Figura 9, painel B) independente dos animais estarem coinfectados ou infectados somente por *T. gondii*. Estes níveis foram estatisticamente diferentes quando comparados aos encontrados para os camundongos BALB/c (Figura 9, painel A) e C57BL/6 (Figura 9, painel B) (b, $P < 0,05$) sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*).

Na presença de ConA, se observa que a produção de IFN- γ aumenta no decorrer da infecção por *T. gondii* em camundongos BALB/c e C57BL/6, atingindo produção máxima no 14º dia e a partir de então tende a declinar. Esta produção após 7, 14 e 21 dias de infecção é significativamente diferente quando comparado ao valor obtido para animais sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*) (Figura 9, painel C e D) (b, $P < 0,05$). Nos camundongos BALB/c coinfectados a produção de IFN- γ se comporta de maneira semelhante a observada em animais infectados por *T. gondii*, porém a produção máxima de IFN- γ ocorre somente no 21º dia após infecção. Nestes animais, os níveis de IFN- γ produzidos após 14 e 21 dias de infecção são significativamente diferentes quando comparados ao valor obtido para animais infestados apenas com *M. musculus* (dia 0) (Figura 9, painel C) (a, $P < 0,05$). Nos animais C57BL/6 coinfectados e infectados por *T. gondii*, os níveis de IFN- γ produzidos após 7, 14 e 21 dias de infecção foram significativamente diferentes quando comparados aos encontrados em animais infestados apenas com *M. musculus* (dia 0) e sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*) (Figura 9, painel D)

Na presença de STAg, a produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por *T. gondii* foi aumentando gradualmente até o 14º dia após infecção, e a partir de então manteve-se constante. Este aumento na produção de IFN- γ induzido por *T. gondii* no decorrer da infecção, foi significativamente diferente do observado nos animais sem infecção (Figura 9 painel E) (b, $P < 0,05$) e os níveis produzidos no 14º e 21º dia após infecção foram maiores que os encontrados no 7º dia (Figura 9, painel E) (d, $P < 0,05$). No 14º dia após infecção,

a concentração de IFN- γ foi maior que a observada nos animais coinfectados no mesmo período (Figura 9, painel E), mas sem diferença estatística. Camundongos BALB/c coinfectados produziram níveis de IFN- γ no decorrer da infecção por *T. gondii*, maiores que os encontrados nos animais infestados por *M. musculus* (Figura 9, painel E) (a, $P < 0,05$), atingindo o pico de produção somente no 21º dia após infecção, quando os níveis são semelhantes aos dos camundongos infectados apenas por *T. gondii*. A produção de IFN- γ por camundongos C57BL/6 infectados apenas por *T. gondii* foi mais elevada no decorrer quando comparada com animais BALB/c na mesma condição, mostrando diferença estatística no 21º (Figura 9, painel F) ($\neq$, $P < 0,05$). O aumento na produção de IFN- γ induzido por *T. gondii* no decorrer da infecção, foi significativamente diferente do observado nos animais sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*) (Figura 9, painel F) (b, $P < 0,05$). No 14º e 21º dia após infecção, os níveis de IFN- γ produzidos por células do baço de camundongos infectados por *T. gondii* foram maiores que os observados nos animais coinfectados no mesmo período, porém sem diferença estatística em relação a este grupo, mas superiores aos produzidos após 7 dias de infecção (Figura 10, painel F) (d, $P < 0,005$). Nos animais coinfectados, há um aumento nos níveis de IFN- γ na medida que a infecção por *T. gondii* se desenvolve atingindo uma produção máxima no 21º dia. Os níveis de IFN- γ nos dias 7, 14 e 21 após infecção foram maiores que os observados em animais infestados por *M. musculus* apenas (Figura 9, painel F) (a, $P < 0,005$).

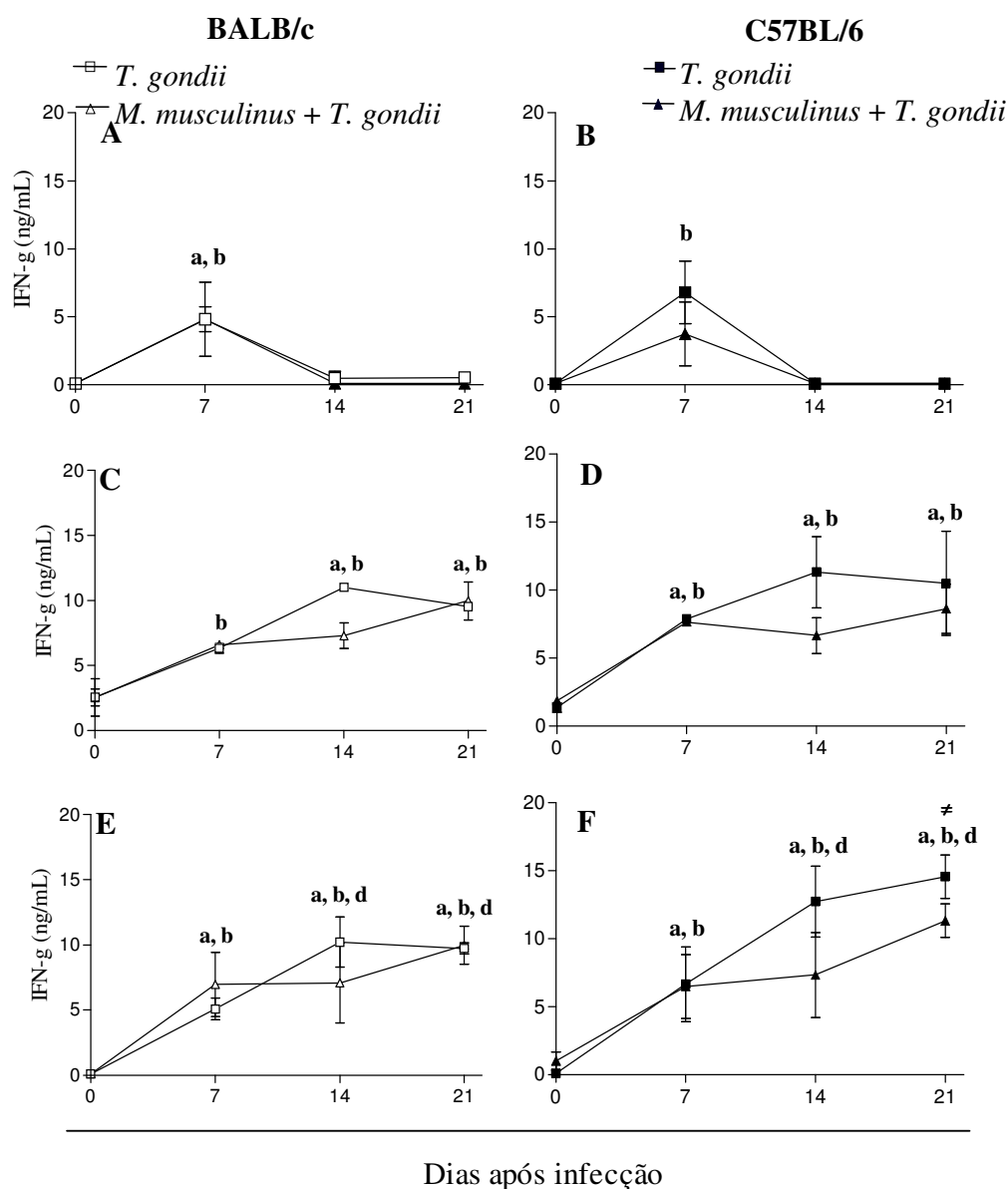


Figura 9. Comparação dos níveis de IFN- γ detectados em sobrenadantes de cultura de células do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e infectados ou não com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Células esplênicas foram coletadas no dia 0, 7, 14 e 21 após infecção e cultivadas sem estímulo (meio) (Figuras A e B), na presença de concanavalina A [ConA (5 μ g/mL)] (Figuras C e D) ou antígeno solúvel de taquizoítas [STAg (5 μ g/mL)] (Figuras E e F). O sobrenadante foi coletado 72 horas após para avaliar os níveis de IFN- γ por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). As barras representam o desvio padrão.

a, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo infestado apenas por *M. musculus* (dia 0).

b, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo sem nenhuma infecção (dia 0).

d, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo com 7 dias de infecção por *T. gondii*.

#, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo BALB/c infectado por *T. gondii*.

Quando células do baço foram cultivados sem estímulo (meio) não foi verificada a produção de IL-4 em nenhum dos grupos tanto da linhagem BALB/c como C57BL/6 (dados não mostrados). Na presença de ConA, foram produzidos níveis elevados de IL-4 por camundongos BALB/c não infectados (dia 0 de infecção por *T. gondii*) e infestados com *M. musculus* (dia 0) (Figura 10 painel A). Nos animais infectados por *T. gondii*, esta produção foi suprimida no decorrer da infecção, de forma que aos 7, 14 e 21 dias os níveis de IL-4 foram diferentes dos encontrados nos animais não infectados (dia 0 de infecção por *T. gondii*) (Figura 10 painel A) (b, $P < 0,05$). Camundongos BALB/c infectados por *T. gondii* apresentaram maior produção de IL-4 quando comparados aos animais C57BL/6 submetidos às mesmas condições, sendo que aos 7 dias de infecção, camundongos BALB/c produziram níveis superiores aos verificados em C57BL/6 (Figura 10 painel A e B) (Φ , $P < 0,05$). Os animais BALB/c coinfectados apresentaram sempre uma produção maior de IL-4 quando comparados aos da mesma linhagem infectados por *T. gondii*, bem como aos animais C57BL/6 coinfectados. Observa-se que aos 7 e 14 dias de infecção, essa produção assume diferença quando comparada aos animais infectados por *T. gondii* (Figura 10 painel A) (*, $P < 0,05$) e foi maior também quando comparada aos animais C57BL/6 coinfectados aos 7 dias de infecção por *T. gondii* (Figura 10 painel A e B) (#, $P < 0,05$). Esplenócitos de camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* e estimulados com ConA, produziram níveis baixos e constantes de IL-4 no decorrer da infecção, porém sempre inferiores aos encontrados nos animais coinfectados, mas não estatisticamente diferentes quando comparados com estes (Figura 10 painel B).

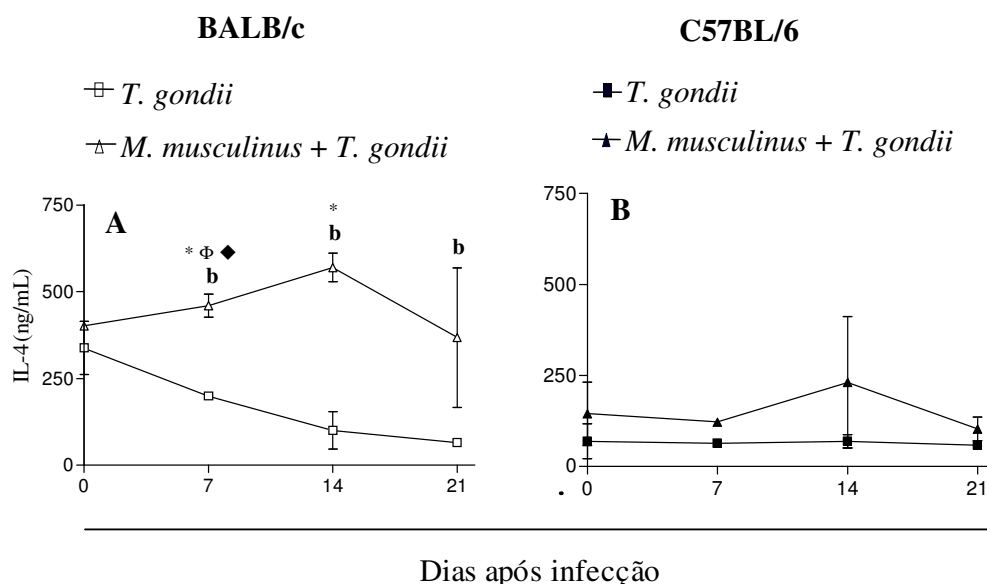


Figura 10. Comparação dos níveis de IL-4 detectados em sobrenadantes de cultura de células do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e infectados ou não com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Células do baço foram coletadas no dia 0, 7, 14 e 21 após infecção e cultivadas na presença de concanavalina A [ConA (5 µg/mL)]. O sobrenadante foi coletado 48 horas após para avaliar os níveis de IFN-γ por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). As barras representam o desvio padrão.

b, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo sem nenhuma infecção (dia 0).

*****, $P < 0,05$ quando comparado com o camundongo da mesma linhagem coinfectado.

#, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo C57BL/6 coinfectado.

Φ, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo C57BL/6 infectado por *T. gondii*.

Células do baço cultivados sem estímulo (meio) produziram níveis basais de IL-5 em ambos os grupos tanto da linhagem BALB/c como C57BL/6 (dados não mostrados). Na presença de ConA, animais BALB/c coinfectados produziram sempre níveis de IL-4 maiores que os infectados por *T. gondii*, e estes são diferentes aos 7 e 14 dias de infecção (Figura 11, painel B) (*, $P < 0,05$). Observa-se que em ambos os grupos, há uma queda na produção de IL-5 no 14º dia após infecção, mas estes valores não diferem dos encontrados no dia 0, 7 e 21 após infecção por *T. gondii* (Figura 11, painel A). Camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* mostram um aumento gradual nos níveis de IL-5, sendo que aos 21 dias de infecção estes valores são superiores aos encontrados na linhagem BALB/c (Figura 11, painel B) (ω , $P < 0,05$). Camundongos C57BL/6 coinfectados produzem sempre níveis de IL-5 maiores que os infectados por *T. gondii* e os animais BALB/c submetidos às mesmas condições (Figura 11, painel B). No entanto, estes valores não são diferentes quando comparados com os animais do mesmo grupo infectados por *T. gondii*, mas são superiores aos encontrados em BALB/c coinfectado após 14 dias de infecção (Figura 11, painel A e B) (Θ , $P < 0,05$). Na presença de STAg, níveis basais de IL-5 foram produzidos por esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 (dados não mostrados).

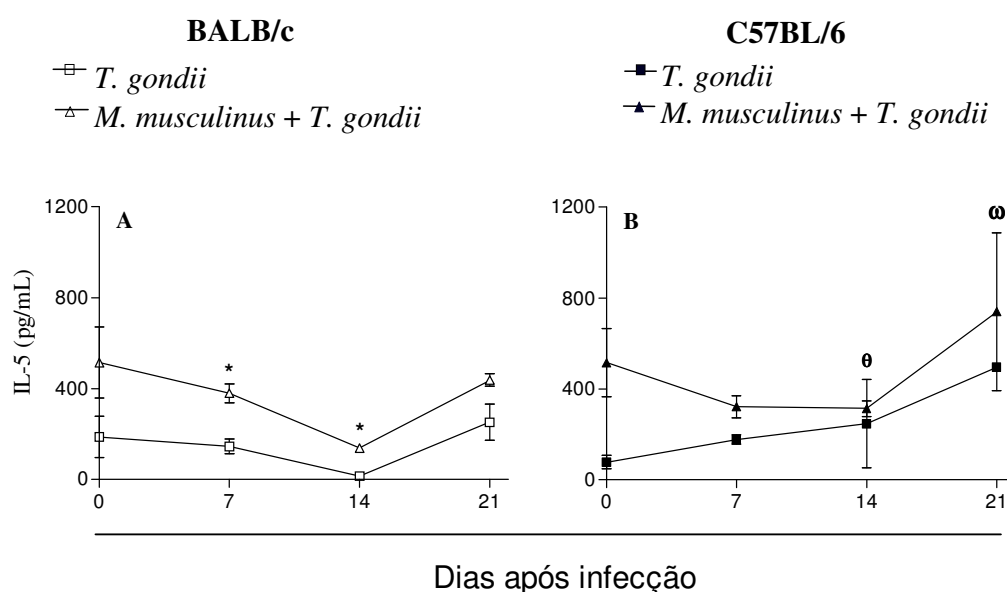


Figura 11. Comparação dos níveis de IL-5 detectados em sobrenadantes de cultura de células do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e infectados ou não com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Células do baço foram coletadas no dia 0, 7, 14 e 21 após infecção e cultivadas na presença de concanavalina A [ConA (5 µg/mL)] (Figuras A e B). O sobrenadante foi coletado 48 horas após para avaliar os níveis de IL-5 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). As barras o desvio padrão.

*, $P < 0,05$ quando comparado com o camundongo da mesma linhagem coinfectado.

⊖, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo BALB/c coinfectado

ω, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo BALB/c infectado por *T. gondii*.

Os níveis de IL-10, produzidos por células do baço cultivados sem estímulo (meio) foram mais elevados no 7º dia após infecção por *T. gondii* quando comparados aos produzidos nos dias

0, 14 e 21, tanto da linhagem BALB/c (Figura 12, painel A) como C57BL/6 (Figura 12, painel B) independente dos animais estarem coinfectedados ou infectados somente por *T. gondii*. Estes níveis foram estatisticamente diferentes quando comparados aos encontrados para os camundongos BALB/c (Figura 12, painel A) (b, $P < 0,05$) e C57BL/6 (Figura 12, painel B) (b, $P < 0,05$) sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*), e BALB/c coinfectedados quando comparados aos infestados apenas com *M. musculus* (dia 0) (Figura 12, painel A) (a, $P < 0,05$). Observa-se que animais BALB/c coinfectedados induzem a produção de níveis mais elevados de IL-10 aos 7 dias de infecção quando comparados com C57BL/6 coinfectedados (Figura 12, painel A e B) (#, $P < 0,05$). Quando camundongos C57BL/6 são coinfectedados, estes passam a produzir menos IL-10 do que animais da mesma linhagem infectados por *T. gondii* (Figura 12, painel A e B) (*, $P < 0,05$).

Na presença de ConA, se observa que os níveis de IL-10 em camundongos BALB/c infectados por *T. gondii* são em geral mais elevados que os encontrados em BALB/c coinfectedados, porém não são diferentes estatisticamente (Figura 12, painel C). A produção de IL-10 em camundongos de ambas as linhagens, independente se infectados por *T. gondii* ou coinfectedados se comporta de maneira semelhante no decorrer da infecção, porém BALB/c produz sempre níveis mais elevados do que C57BL/6 (Figura 12, painel C e D). Assim, no dia 0, 7, 14 e 21 após infecção, BALB/c infectado por *T. gondii* produz mais IL-10 do que C57BL/6 (Figura 12, painel C e D) (Φ , $P < 0,05$). Por outro lado, BALB/c coinfectedado produz mais IL-10 do que C57BL/6 aos 14 dias de infecção (Figura 12, painel C e D) (#, $P < 0,05$).

Na presença de STAg, camundongos BALB/c sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*) e os infestados apenas com *M. musculus* (dia 0) não induzem a produção de IL-10 (Figura 12, painel E). Mas, aos 7 dias de infecção, se observa um pico de produção de IL-10 em ambos os grupos, e a partir de então estes valores tendem a declinar (Figura 12, painel E). Independente do grupo, os níveis de IL-10 aos 7, 14 e 21 dias foram superiores aos encontrados nos grupos controle, ou seja, sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*) (Figura 12, painel E) (b, $P < 0,05$) e os infestados apenas com *M. musculus* (dia 0) (Figura 12, painel E) (a, $P < 0,05$). Observa-se que aos 7 dias de infecção, camundongos BALB/c de ambos os grupos produzem

níveis semelhantes de IL-10 quando comparados a C57BL/6. No entanto, aos 14 e 21 dias, estes valores passam a ser menores nos animais C57BL/6 quando comparados a BALB/c, sendo que estes aos 14 dias de infecção produzem mais IL-10 quando comparados aos camundongos C57BL/6 na mesma condição (Figura 12, painel E e F) (#, $P < 0,05$). Como observado para BALB/c, na presença de STAg, camundongos C57BL/6 sem infecção (dia 0 de infecção por *T. gondii*) e os infestados apenas com *M. musculus* (dia 0) não induzem a produção de IL-10 (Figura 12, painel F). Aos 7 dias de infecção, se observa um pico de produção de IL-10 em ambos os grupos, e a partir de então estes valores declinam, independente se os animais foram infectados por *T. gondii* ou coinfectados. (Figura 12, painel F).

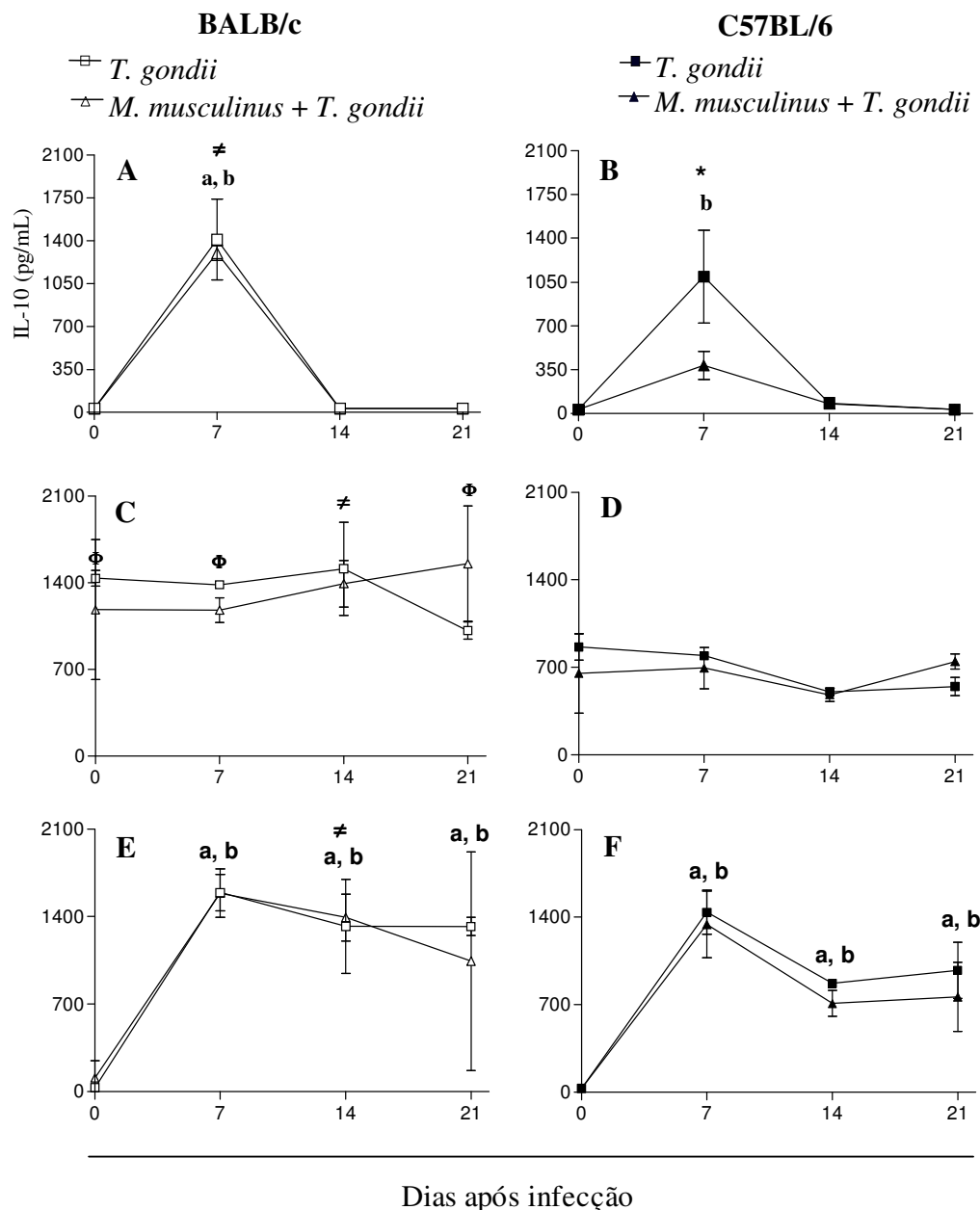


Figura 12. Comparação dos níveis de IL-10 detectados em sobrenadantes de cultura de células do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* e infectados ou não com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Células esplênicas foram coletadas no dia 0, 7, 14 e 21 após infecção e cultivadas sem estímulo (meio) (Figura A e B), na presença de concanavalina A [ConA (5 µg/mL)] (Figura C e D) ou antígeno solúvel de taquizoítas [STAg (5 µg/mL)] (Figura E e F). O sobrenadante foi coletado 48 horas após para avaliar os níveis de IL-10 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). As barras representam o desvio padrão.

a, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo infestado apenas por *M. musculus* (dia 0).

b, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo sem nenhuma infecção (dia 0).

*****, $P < 0,05$ quando comparado com o camundongo da mesma linhagem coinfectado.

#, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo C57BL/6 coinfectado.

Φ, $P < 0,05$ quando comparado ao camundongo C57BL/6 infectado por *T. gondii*.

4.9- Alterações inflamatórias nos órgãos periféricos e SNC de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 7, 14, 21 e 30 dias de infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*

O fígado apresentou lesões patológicas aos 7 dias de infecção por *T. gondii*. Estas lesões foram caracterizadas por infiltrados inflamatórios constituídos principalmente por células mononucleadas. Estes infiltrados se apresentaram organizados como focos. Os focos aumentaram em número em ambas as linhagens até 14 dias de infecção, sendo que a partir de então houve uma diminuição gradativa. Camundongos co-infectados apresentaram lesões similares aos infectados por *T. gondii*, entretanto, alguns focos inflamatórios foram constituídos por células polimorfonucleadas. As lesões hepáticas nos camundongos BALB/c foram sempre mais brandas que as de camundongos C57BL/6.

Lesões pulmonares foram observadas inicialmente em ambas as linhagens aos 7 dias de infecção por *T. gondii*. Estas lesões se caracterizaram pela presença de infiltrados inflamatórios nos septos alveolares, constituídos por células mononucleadas, levando a uma pneumonia intersticial (Figura 13, painel A). Além dos infiltrados inflamatórios mononucleados, os animais co-infectados apresentaram infiltrados constituídos por células polimorfonucleadas. Em alguns animais estes infiltrados estavam associados com áreas necróticas, levando a uma pneumonia intersticial supurativa (Figura 13, painel B e C). As lesões pulmonares foram mais graves em ambas as linhagens em animais co-infectados aos 7 e 14 dias de infecção.

As alterações histológicas foram observadas no baço desde 7 dias após infecção por *T. gondii*, quando foram observados centros germinativos típicos na polpa branca dos animais BALB/c e C57BL/6. Camundongos duplamente infectados não apresentaram centros germinativos típicos na polpa branca neste período de infecção.

As lesões no SNC foram verificadas aos 14 dias de infecção por *T. gondii* e foram caracterizadas por manguitos perivasculares constituídos por células inflamatórias mononucleadas e infiltrados inflamatórios mononucleados organizados como focos, os nódulos gliais. Foram observadas também células inflamatórias espalhadas pelo parênquima, constituindo os infiltrados difusos. Os animais C57BL/6 e BALB/c apresentaram também células inflamatórias nas meninges, esta infiltração de células inflamatórias apresentou-se intensa

principalmente nos animais C57BL/6 com o avançar do tempo de infecção. Estas lesões inflamatórias são características da meningoencefalite induzida por *T. gondii*. As alterações inflamatórias foram observadas em todo o SNC, sem predileção por área e em geral não foram observadas em locais próximos aos parasitos. As lesões foram mais graves no SNC dos animais C57BL/6 e BALB/c a partir de 21 dias de infecção, entretanto, os animais C57BL/6 sempre apresentaram uma meningoencefalite mais grave e progressiva, quando comparados com os animais BALB/c. As lesões inflamatórias no SNC dos animais co-infectados foram semelhantes as dos animais mono-infectados, entretanto, os animais C57BL/6 sempre apresentaram lesões mais graves quando comparados com os animais BALB/c, e estas foram relacionadas ao maior parasitismo neste órgão nos animais C57BL/6 mono ou co-infectados (Tabela 2).

Tabela 2. Número de cistos/pseudocistos no SNC de camundongos BALB/c e C57BL/6 previamente infestados ou não com *M. musculus* 30 dias após infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*

Linhagem do camundongo	Número de cistos/pseudocistos ^a	
	Infecção por <i>T. gondii</i>	Coinfectado com <i>M. musculus</i> e <i>T. gondii</i>
BALB/c	4,3 ± 1,5	7,7 ± 10,7
C57BL/6	18,5 ± 3,5*	20,0 ± 4,2

^aOs resultados são a média e o desvio padrão do número de cistos/pseudocistos em 40 campos microscópicos por seção tecidual de duas seções por camundongo (distância entre elas 40 µm), de três camundongos por grupo.

*, P<0,05 quando comparado ao BALB/c infectados por *T. gondii*.

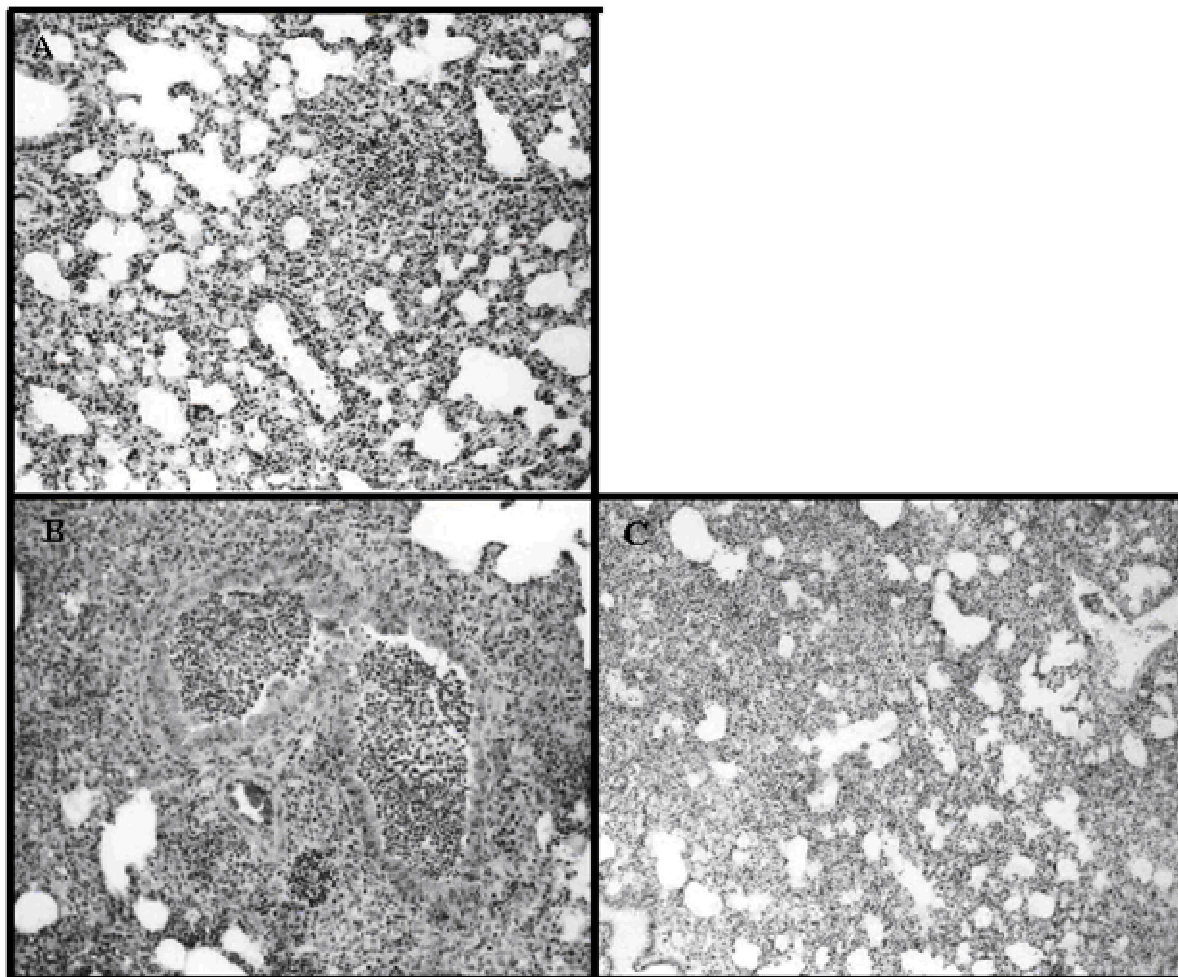


Figura 13. Patologia pulmonar de camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados previamente ou não com *M. musculus* e infectados com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por sete dias. (A) C57BL/6 infectado apenas por *T. gondii*. (B) C57BL/6 coinfestado (C) BALB/c coinfestado. Ameto de 50X.

4.10- Mortalidade de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* foram infectados oralmente com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e a mortalidade acompanhada diariamente por um período de 30 dias conforme demonstrado na Figura 14.

Constatou-se que quando animais de ambas as linhagens foram infectados com 100 cistos de *T. gondii*, os camundongos C57BL/6 apresentaram uma maior mortalidade (100%) quando comparado aos BALB/c (13%) no período observado ($P < 0,0001$) (Figura 14). Apesar da mortalidade dos camundongos BALB/c coinfectados ter iniciado antes (8º dia) que a de animais C57BL/6 (12º dia) não houve diferença estatística entre os dois grupos durante o período de observação ($p = 0,57$) (Figura 14).

Quando camundongos BALB/c são coinfectados, estes começam a morrer a partir do 8º dia atingindo 100% de mortalidade 27 dias após infecção enquanto que neste mesmo período apenas 13% dos animais infectados por *T. gondii* apenas morrem ($P = 0,0004$) (Figura 14). Já os camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* começam a morrer a partir do 8º dia atingindo 100% de mortalidade 12 dias após a infecção, enquanto que os camundongos da mesma linhagem coinfectados começam a morrer a partir do 12º dia atingindo 100% de mortalidade no 19º após infecção. ($P = 0,001$) (Figura 14).

A partir destes dados conclui-se que camundongos BALB/c coinfectados tornam-se mais susceptíveis a infecção oral com 100 cistos de *T. gondii* enquanto que os animais C57BL/6 submetidos às mesmas condições se apresentam mais resistentes à infecção quando comparados com camundongos da mesma linhagem mono-infectados.

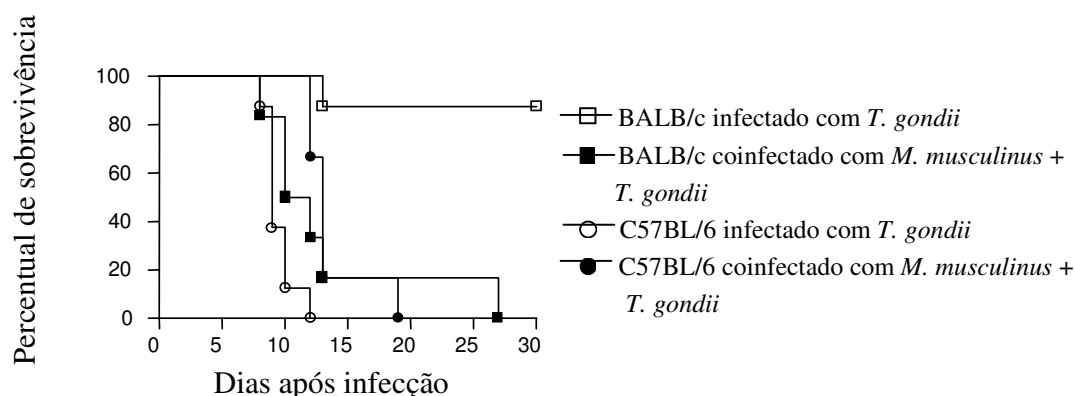


Figura 14. Susceptibilidade de camundongos BALB/c e C57BL/6 previamente infestados com *M. musculus* à infecção oral com 100 cistos da cepa Me-49 de *T. gondii*. Camundongos infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* foram infectados oralmente com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e a mortalidade acompanhada diariamente por um período de 30 dias. Os resultados são representativos de 10 animais por grupo experimental.

4.11- Alterações inflamatórias no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 sete dias após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*

À análise histológica aos 7 dias de infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, o intestino delgado dos animais C57BL/6 apresentou uma intensa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e submucosa. Em algumas áreas o comprimento das vilosidades apresentava-se reduzido e a espessura destas aumentada. Além disso, observou-se uma perda focal das células epiteliais superficiais em alguns locais, indicando os estágios mais precoces de necrose intestinal (Figura 15, painel B). Os animais C57BL/6 co-infectados com *M. musculus* apresentaram lesões intestinais menos graves que aqueles infectados apenas por *T. gondii* (Tabela 3) e necrose não foi verificada nestes animais neste tempo de infecção (Figura 15, painel D). Camundongos BALB/c infectados com 100 cistos da cepa ME-49 apresentaram suave infiltrado inflamatório em alguns locais da lâmina própria e submucosa (Figura 15, painel A). Entretanto, animais co-infectados apresentaram lesões moderadas em alguns locais do intestino (Tabela 3) (Figura 15, C).

Tabela 3- Análise das lesões do intestino delgado de camundongos de BALB/c e C57BL/6 sete dias após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.

Linhagem do camundongo	Score inflamatório ^a	
	Infecção por <i>T. gondii</i>	Coinfectado com <i>M. musculus</i> e <i>T. gondii</i>
BALB/c	+	++
C57BL/6	++++	+++

^aA análise patológica foi realizada em toda a extensão do intestino delgado. Três animais foram utilizados por grupo experimental.

Duas seções por camundongo foram avaliadas e as alterações inflamatórias foram graduadas como: +, suave; ++ moderada; +++ grave; ++++, muito grave.

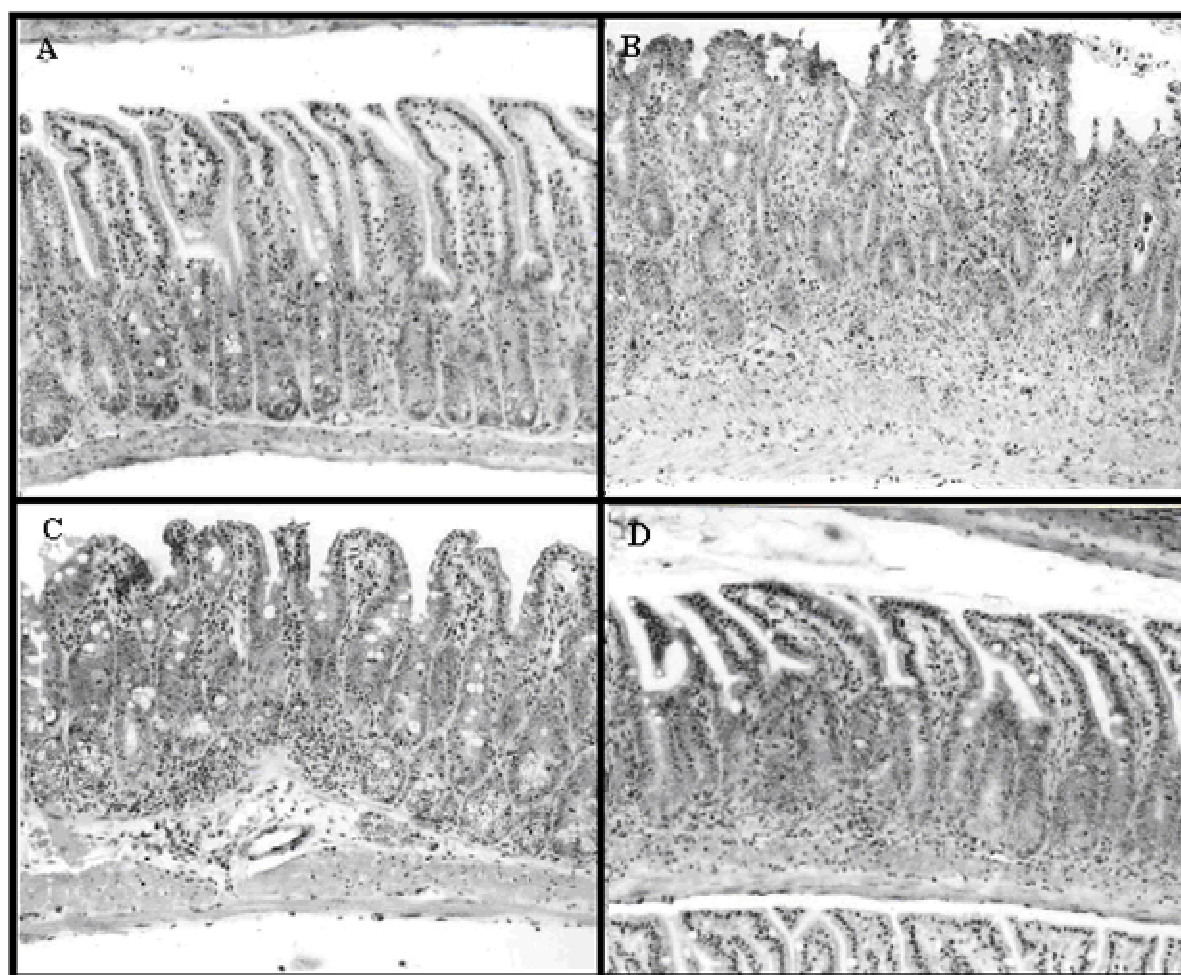


Figura 15. Patologia intestinal de camundongos BALB/c e C57BL/6 sete dias após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. (A) BALB/c infectado apenas por *T. gondii*. (B) C57BL/6 infectado apenas por *T. gondii*. (C) BALB/c coinfestado (D) C57BL/6 coinfestado. Aumento de 50 X.

4.12- Avaliação do número de mastócitos no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 sete dias após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*

4.12.1- Quantificação de mastócitos no duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo de camundongos BALB/c e C57BL/6

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* foram infectados oralmente com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e sete dias após a infecção o intestino delgado foi coletado e número de mastócitos presentes no duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo foram quantificados conforme demonstrado na Tabela 4.

Foi observado um aumento do número de mastócitos presentes em todas as porções do intestino dos camundongos BALB/c coinfectados com *M. musculus* e *T. gondii* quando comparado com os animais da mesma linhagem infectados por *T. gondii* ($P < 0,05$) (Tabela 4). O duodeno foi a porção que apresentou maior número de mastócitos tanto no grupo infectado por *T. gondii* (142 ± 27) como no coinfectado ($226 \pm 1,4$) (Tabela 4). Quando o número de mastócitos presentes nas porções do intestino dos camundongos C57BL/6 coinfectados com *M. musculus* e *T. gondii* foi comparado com os animais infectados por *T. gondii*, somente o duodeno dos animais coinfectados apresentou um aumento significativo ($68 \pm 4,2$) ($P < 0,05$) (Tabela 4). O jejuno proximal foi a porção que apresentou maior número de mastócitos ($65 \pm 2,8$) no grupo infectado por *T. gondii* e no grupo coinfectado os valores foram os mesmos no duodeno ($68 \pm 4,2$) e jejuno proximal ($68 \pm 5,7$) (Tabela 4).

Estes resultados mostram que as duas linhagens de camundongos coinfectados com *M. musculus* e *T. gondii* apresentam um maior número de mastócitos no duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo em relação animais infectados por *T. gondii*, porém este aumento é mais significativo nos animais da linhagem BALB/c.

Tabela 4- Quantificação de mastócitos nas porções do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 sete dias após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.

□

Linhagem do camundongo	Número de Mastócitos ^a							
	Infectado por <i>T. gondii</i>				Coinfectado com <i>M. musculus</i> e <i>T. gondii</i>			
	duodeno	jejuno proximal	jejuno distal	íleo	duodeno	jejuno proximal	jejuno distal	íleo
BALB/c	142 ± 27	74,5 ± 3,5	31 ± 2,8	4,5 ± 2,1	226 ± 1,4*	197 ± 4,9*	108 ± 18,4*	153 ± 7,8*
C57BL/6	43 ± 2,8	65 ± 2,8	14 ± 1,4	11 ± 1,4	68 ± 4,2*	68 ± 5,7	19,5 ± 2,1	21,5 ± 3,5

^aOs resultados são a média e o desvio padrão do número de mastócitos em duas seções de cada porção do intestino delgado de três animais por grupo experimental.

*, P<0,05 quando comparado aos valores obtidos na mesma porção do intestino delgado de camundongos infectados por *T. gondii* apenas.

4.12.2- Quantificação de mastócitos no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados ou não por um período de 30 dias com *M. musculus* foram infectados oralmente com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e sete dias após a infecção o intestino delgado foi coletado e os mastócitos foram quantificados. Os resultados representam a soma do número de mastócitos presentes no duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo obtendo-se assim o número total de mastócitos presentes em toda a extensão do intestino. Foi observado um maior número de mastócitos no intestino dos camundongos BALB/c (252 ± 25,5) infectados por *T. gondii* quando comparado aos animais C57BL/6 (133 ± 8,5) submetidos as mesmas condições (P=0,024) (Figura 16). A diferença no número de mastócitos foi mais expressiva ainda quando comparou-se camundongos BALB/c (685 ± 17)

infectados com *M. musculus* e *T. gondii* com a linhagem C57BL/6 ($177 \pm 11,3$) na mesma condição ($P=0,0008$) (Figura 16).

Quando o número de mastócitos dos camundongos infectados por *T. gondii* e os coinfetados da mesma linhagem foi comparado, verificou-se que camundongos BALB/c coinfetados apresentaram um aumento na quantidade de mastócitos em torno de 2,7 vezes maior que o observado nos animais infectados por *T. gondii* ($P=0,025$) (Figura 16). Fazendo a mesma comparação para camundongos C57BL/6, verificou-se que este aumento no número de mastócitos em relação aos animais infectados por *T. gondii* foi somente em torno 1,3 vezes ($P=0,048$) (Figura 16). Estes resultados mostram que as duas linhagens de camundongos coinfetados apresentam um maior número de mastócitos em relação aos animais infectados por *T. gondii*, porém este aumento é mais pronunciado nos animais da linhagem BALB/c.

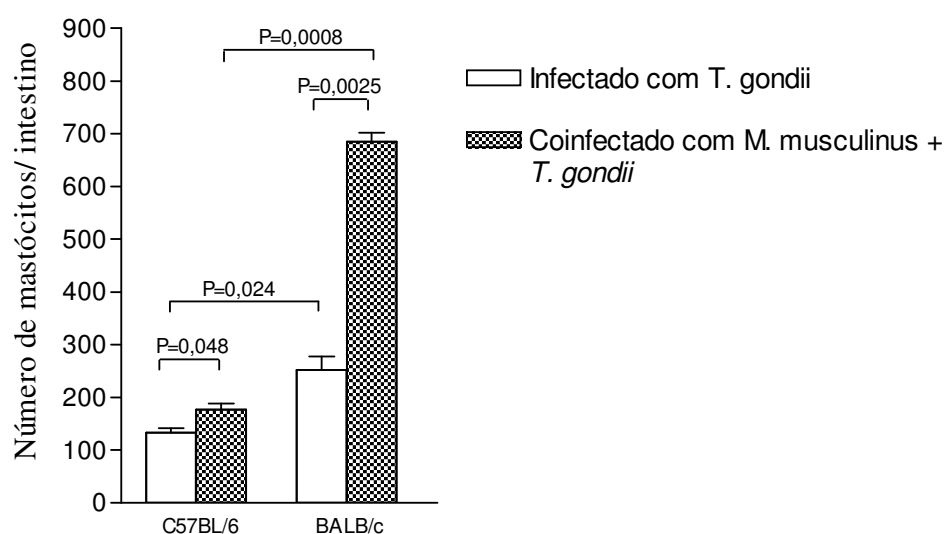


Figura 16. Quantificação de mastócitos no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 sete dias após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os resultados representam a média e o desvio padrão do número de mastócitos em duas seções do intestino de três animais por grupo experimental.

4) DISCUSSÃO

Neste estudo, camundongos BALB/c e C57BL/6 infestados com *M. musculus* apresentaram prurido intenso, queda do pêlo (principalmente na região do abdômen), pêlo arrepiado, e redução de peso. Jungmann et al., (1996a), acompanharam camundongos BALB/c mantidos com animais infestados com *M. musculus* a partir do 15º dia de nascimento até 13 meses para avaliar o aparecimento dos sinais clínicos iniciais e desenvolvimento da doença. Observaram que os animais infestados com *M. musculus* apresentaram pele avermelhada acompanhada por erupções superficiais, formação de crostas e eventualmente sangramento. Na fase mais tardia da doença, observaram perda generalizada do pêlo e redução no peso, onde animais que no início pesavam 24 g, atingiram 11 g e morreram com cerca de 16 meses de idade. A ausência de sinais clínicos mais pronunciados e menor perda de peso verificados nos animais utilizados no nosso trabalho do que o constatado por Jungmann et al., (1996a) pode ser em parte pelo fato de no nosso estudo animais terem sido utilizados nos experimentos na fase inicial da doença, ou seja, um mês após a infestação com *M. musculus*.

Camundongos de ambas as linhagens quando previamente infestados com *M. musculus* tornam-se mais susceptíveis a infecção oral com uma baixa dose (10) de cistos de *T. gondii* do que animais infectados apenas por *T. gondii*. Ao analisar as alterações inflamatórias no SNC destes animais, foi verificado que ambas as linhagens, independente se infectadas por *T. gondii* ou coinfetadas, apresentaram lesões no SNC aos 14 dias de infecção. Estas lesões se tornaram mais intensas a partir do 21º dia de infecção, quando foi constatada meningoencefalite mais grave em camundongos C57BL/6 do que em BALB/c. As lesões inflamatórias no SNC dos animais coinfetados foram semelhantes as encontradas nos animais infectados por *T. gondii*, porém, C57BL/6 apresentaram lesões mais graves quando comparadas a BALB/c. Na encefalite toxoplásmica há um recrutamento significativo de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no cérebro, as quais produzem IFN- γ e TNF- α (SCHLUTER et al, 1997). Foi demonstrado que a micróglia pode controlar a multiplicação de *T. gondii* através de mecanismos dependentes de iNOS e TNF- α .

(CHAO et al., 1993; LANGERMANNS et al, 1992). Schluter et al., (1999) demonstraram que camundongos BALB/c são mais resistentes a infecção por *T. gondii* quando comparados a C57BL/6 apesar da menor expressão da enzima iNOS no SNC. Em nosso trabalho, apesar de grande quantidade de células inflamatórias, a multiplicação dos parasitos não foi eficientemente controlada nos animais C57BL/6 mono e co-infectados, sugerindo que embora o recrutamento de células inflamatórias seja eficiente, estas não conseguem controlar o parasitismo no SNC. Ao contrário, a grande quantidade de células inflamatórias no SNC pode ter contribuído para a patologia neste órgão e a mortalidade dos animais.

Quanto às alterações inflamatórias nos órgãos periféricos, estas foram observadas no fígado aos 7 dias de infecção, se tornaram mais graves até o 14º dia após infecção por *T. gondii* e a partir de então diminuíram gradativamente. Os camundongos coinfectados apresentaram lesões semelhantes, porém com a presença de células polimorfonucleadas. As lesões pulmonares foram mais graves em ambas as linhagens de camundongos co-infectados aos 7 e 14 dias de infecção, quando foi constatada pneumonia intersticial supurativa em alguns animais. Noviana et al, (2004) verificaram que cães infestados com *S. scabiei* têm um número elevado de mastócitos na derme, fígado, submucosa do jejuno e mucosa do reto quando comparado a animais controle. A desgranulação de mastócitos libera citocinas, incluindo TNF- α , que aumenta a expressão de moléculas de adesão para leucócitos no endotélio vascular (E-selectina e ICAM-1), promovendo recrutamento de leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células Th2 para o tecido. Sugere-se que os infiltrados inflamatórios constituídos de células polimorfonucleadas encontrados no fígado e pulmão dos camundongos BALB/c e C57BL/6 coinfectados estejam relacionados a presença e desgranulação de mastócitos, favorecendo a patologia nestes órgãos, que associada ao desgaste excessivo dos animais decorrente da infestação por *M. musculus* contribuiu para a maior susceptibilidade a infecção por *T. gondii*.

Relatos anteriores evidenciaram a produção de IL-4 por PBMC de indivíduos com escabiose na ausência de estímulo (WALTON et al., 2004). Em nosso trabalho, esplenócitos cultivados sem estímulo (meio) não foram capazes de produzir níveis detectáveis de IL-4. No entanto, na

presença de ConA, esplenócitos dos animais infestados apenas com *M. musculus* e coinfectados de ambas as linhagens mostraram um aumento na produção de IL-4 e IL-5 quando comparado aos animais infectados por *T. gondii*. Este achado, somado a maior quantidade de eosinófilos presentes no sangue periférico de animais infestados com *M. musculus*, é indicativo de resposta imune do tipo Th2. Esta resposta imune induzida por *M. musculus* diminuiu a produção de IFN- γ em ambas as linhagens de camundongos em relação ao que foi encontrado nos animais infectados por *T. gondii* apenas. No entanto, a menor quantidade de IFN- γ não interferiu no controle da multiplicação do parasito no SNC pois não houve diferença no número de cistos aos 30 dias de infecção entre animais coinfectados e infectados apenas por *T. gondii*. Quando esplenócitos foram cultivadas na presença de SMAg, não foi detectada a produção de nenhuma citocina nos grupos estudados de ambas as linhagens de camundongos. Arlian et al., (2003) avaliaram a expressão de citocinas em queratinócitos e fibroblastos humanos estimulados com extrato de *Sarcoptes scabiei* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Em nosso estudo, esplenócitos foram estimulados com uma concentração 10 vezes menor (5 $\mu\text{g/mL}$) de SMAg, que pode não ter sido capaz de estimular a produção de citocinas em níveis mensuráveis por meio de ELISA.

Camundongos BALB/c, independente se infectados por *T. gondii* ou coinfectados induzem a produção de IgG total *T. gondii*-específica mais precocemente e em maiores níveis que animais C57BL/6 submetidos as mesmas condições. A mudança de isotipo para IgG1 e IgG2a está na dependência da resposta induzida pelo agente infeccioso. Assim um perfil de resposta Th2 induz a produção de IL-4 que por sua vez estimula células B a produzirem IgG1. A mudança para o isotipo IgG2a por sua vez depende da produção de IFN- γ , que é induzida por uma resposta Th1 (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Neste estudo verificamos que a produção de IgG2a em ambas as linhagens foi maior que IgG1 e acompanhou o aumento de IgG, porém camundongos BALB/c sempre produziram níveis mais elevados do que C57BL/6, o que está de acordo com a maior produção de IgG total presente nestes animais. Verificamos que a infecção estabelecida com *M. musculus* no momento da infecção por *T. gondii*, contribuiu para a diminuição dos isotipos

IgG1 e IgG2a aos 30 dias de infecção por *T. gondii* o que mostra que *M. musculus* altera a resposta imune humoral a *T. gondii*.

Por meio da determinação dos níveis de IgG antígeno-específicos confirmamos a infestação de camundongos BALB/c e C57BL/6 com *M. musculus*. Constatamos que os níveis específicos de IgG foram diminuindo no decorrer da infecção por *T. gondii* em ambas as linhagens de camundongos o que sugere que a resposta Th1 induzida por *T. gondii* pode estar interferindo na resposta humoral gerada por *M. musculus*. Estudos anteriores verificaram que *T. gondii* têm um efeito inibidor da síntese de IgG *Leishmania*-específica. (SANTIAGO et al., 1999). Apesar da redução nos níveis de IgG em ambas as linhagens de camundongos, verificamos que em BALB/c estes níveis persistiram durante a coinfeção quando comparados com C57BL/6. Trabalhos anteriores mostram uma correlação entre níveis de IgG-*S. scabiei*-específicos e gravidade da doença em cães e coelhos. Assim níveis elevados de anticorpos são encontrados em animais com doença grave e baixos níveis estão presentes em animais com sintomas brandos (ARLIAN; MORGAN, 2000). Em nosso trabalho, embora com um ectoparasito pertencente a outra Família, esta correlação também foi observada, uma vez que camundongos BALB/c manifestaram sinais mais pronunciadas da doença com níveis elevados de IgG enquanto camundongos da linhagem C57BL/6 apresentaram sinais mais brandos com níveis baixos de IgG.

Após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* camundongos susceptíveis, C57BL/6 apresentam mais necrose e inflamação hepática e maior número de taquizoítas nos linfonodos mesentéricos aos sete dias de infecção bem como número de cistos cerebrais aos 30 dias de infecção quando comparados a animais resistentes A/J (MCLEOD et al, 1989). Camundongos BALB/c, que são geneticamente resistentes sobrevivem e C57BL/6, que são geneticamente susceptíveis, morrem após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Sete dias após a infecção quando camundongos C57BL/6 começam a morrer, se observa necrose maciça nas vilosidades e células da mucosa do íleo, sendo esta atribuída a produção local excessiva de IFN- γ , e dependente de células T CD4⁺ (LIESENFELD, 1996). Foi demonstrado que a produção de óxido nítrico induzida pela combinação de IFN- γ e TNF- α por meio da

ativação da iNOS é o principal mediador da patologia intestinal nos animais C57BL/6 (LIESENFELD, 1999).

Suzuki et al., (2000) ao avaliar o papel da IL-10 na imunopatologia da toxoplasmose aguda em camundongos BALB/c e C57BL/6 geneticamente deficientes em IL-10 (IL-10^{-/-}) após infecção oral com a cepa ME-49 de *T. gondii* verificaram que estes animais morrem no período de duas semanas após infecção devido a necrose intestinal. C57BL/6 IL-10^{-/-} apresentaram também alterações inflamatórias no fígado e no pulmão. Porém quando ambas as linhagens foram tratados com mAb anti-IFN- γ , aumenta a sua sobrevivência e diminuem as áreas de necrose no intestino delgado. Estes resultados mostram que IL-10 é necessária para prevenir a patologia intestinal e mortalidade mediada por IFN- γ em ambas as linhagens, independente do animal ser geneticamente resistente (BALB/c) ou susceptível (C57BL/6) a infecção por *T. gondii*.

Os dados de mortalidade e patologia intestinal dos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por via oral com 100 cistos de *T. gondii* obtidos em nosso trabalho reforçam os encontrados por Liesenfeld et al, (1996). No entanto, quando estes animais são infestados previamente com *M. musculus*, camundongos BALB/c tornam-se mais susceptíveis a infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* que os animais infectados por *T. gondii* apenas, enquanto que animais C57BL/6 coinfected tornam-se relativamente mais resistentes à infecção do que o grupo infectado apenas por *T. gondii*. Ao analisar as alterações inflamatórias e o número de mastócitos no intestino delgado destes animais aos 7 dias de infecção, foi constatado que os camundongos BALB/c infectados por *T. gondii* apresentaram um infiltrado inflamatório suave e número significativo de mastócitos, enquanto que animais coinfected apresentaram lesões moderadas em alguns locais do intestino e grande quantidade de mastócitos. Camundongos da linhagem C57BL/6 infectados por *T. gondii* apresentaram lesões inflamatórias graves, com indícios de necrose intestinal e poucos mastócitos, enquanto que os animais coinfected apresentaram lesões intestinais de menor gravidade que os infectados por *T. gondii* e sem evidências de necrose intestinal, porém, com presença de maior número de mastócitos. Como anteriormente citado, Noviana et al, (2004) demonstraram a presença de mastócitos na

submucosa do jejuno e mucosa do reto de cães infestados com *S. scabiei*. O maior número de mastócitos encontrados nos animais coinfectados em nosso trabalho também foi atribuído a infestação prévia com *M. musculus*.

Mastócitos desempenham um papel importante como células efetoras da resposta inflamatória. Cinco minutos após entrar em contato com o antígeno, os mastócitos liberam grânulos pré-formados que contêm histamina proteoglicanas e proteases. Mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico produzidos pela via da cicloxigenase (prostaglandina D₂) e lipoxigenase (leucotrienos) também são liberados. Citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- α e TGF- β) e quimiocinas (MIP-1- α e MCP-1) são sintetizadas e liberadas uma hora após contato com o antígeno (MAYRL; ZUBERIL; LIU, 2003). Estes mediadores têm funções complexas e redundantes na fase aguda e tardia da resposta inflamatória. Sugere-se que citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) induzidas pelo ectoparasito podem estar diminuindo a produção local excessiva de IFN- γ que é responsável pela mortalidade e patologia intestinal verificada nestes animais. Por isso os animais coinfectados apresentaram lesões intestinais de menor gravidade que os infectados por *T. gondii* e sem evidências de necrose intestinal o que resultou na maior sobrevivência dos mesmos.

A partir deste trabalho concluímos que a presença de marcadores (IL-4, IL-5 e eosinófilos) de resposta Th2 induzidos por *M. musculus*, interferem na resposta Th1 induzida por *T. gondii*, o que pode ser verificado pela queda na produção de IFN- γ em camundongos de ambas as linhagens coinfectados. A presença destas citocinas induzidas por *M. musculus* associada a patologia pulmonar grave e perda de peso excessivo contribuíram para a maior susceptibilidade de animais BALB/c e C57BL/6 à infecção por *T. gondii*. Por outro lado, a produção de IFN- γ induzida por *T. gondii*, interferiu na resposta imune induzida por *M. musculus* uma vez que houve redução no número de eosinófilos e diminuição dos níveis de IgG *M. musculus*-específicos nos animais coinfectados. A infestação prévia com *M. musculus* prolongou a sobrevivência e melhorou a imunopatologia no intestino delgado de camundongos C57BL/c

infectados com 100 cistos de *T. gondii*. Assim essa linhagem de animais se beneficiou da resposta imune do tipo Th2 induzida por *M. musculus*.

6) CONCLUSÕES

- A infecção crônica com *M. musculus* induziu uma resposta imune Th2 capaz de interferir na resposta Th1 induzida por *T. gondii*, pois camundongos de ambas as linhagens coinfectados apresentaram redução nos níveis de IFN- γ em relação aos infectados apenas por *T. gondii*.
- A infestação prévia com *M. musculus* tornou camundongos BALB/c e C57BL/6 mais susceptíveis a infecção com uma baixa dose de cistos do que animais infectados apenas por *T. gondii*, o que foi atribuído a grave patologia pulmonar e estado caquético observado nestes animais.
- A potente resposta Th1 induzida por *T. gondii* em camundongos BALB/c e C57BL/6 interferiu na resposta Th2 induzida por *M. musculus*, pois após infecção por *T. gondii* verificou-se uma redução do número de eosinófilos e níveis de IgG *M. musculus*-específicos nos animais coinfectados.
- Citocinas do perfil Th2 induzidas por *M. musculus* protegeram camundongos C57BL/6 da imunopatologia intestinal após infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* prolongando a sobrevivência dos mesmos.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5. ed. Philadelphia: SAUNDERS., 2003, p. 266-268.

ALINE, F.; BOUT, D.; DIMIER-POISSON, L. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 5, p. 2368-2374, 2002.

ARENDS, J. J.; STANISLAW, C. M.; GERDON, D. Effects of sarcoptic mange on lactating sows and growing pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 1495-1499, 1990.

ARLIAN, L. G.; SORLIE, L. B.; VYSZENSKI-MOHER, D. L.; ESTES, S. A. Characterization of *Sarcoptes scabiei* var. *canis* (Acari: Sarcoptidae) antigens and induced antibodies in rabbits. **J. Med. Entomol.**, v. 22, p. 321-323, 1985.

ARLIAN, L. G.; VYSZENSKI-MOHER, D. L.; CORDOVA, D. Host specificity of *Sarcoptes scabiei* var. *canis* (Acari: Sarcoptidae) and the role of host odor. **J. Med. Entomol.**, v. 25, p. 52-56, 1988.

ARLIAN, L. G. Biology, host relations, and epidemiology of *Sarcoptes scabiei*. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 34, p. 139-161, 1989.

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S.; VYSZENSKI-MOHER, D. L., STEMMER, B.L. *Sarcoptes scabiei*: the circulating antibody and induced immunity to scabies. **J. Exp. Parasitol.**, v. 78, p. 37-50. 1994.

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S. serum antibody to *Sarcoptes scabiei* and house dust mites prior to and during infestation with *Sarcoptes scabiei*. **Vet. Parasitol.**, v. 90, n. 4, p. 315-326, 2000.

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S.; NEAL, J. Modulation of cytokine expression in human keratinocytes and fibroblasts by extracts of scabies mites. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, p. 652-656, 2003.

BEAN-KUNDSSEN, D. E.; WAGNER, G. E.; HALL, R. D. Evaluation of the control of *Myobia musculi* infestation on laboratory mice with permethrin. **Lab. Anim. Sci.**, v. 36, p. 268-270, 1986.

BLISS, S. K.; MARSHALL, A. J.; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF- α , and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 α and 1- β in response to *Toxoplasma gondii* antigens. **J. Immunol.**, v. 162, p. 7369-7365, 1999.

BLISS, S. K.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Rapid recruitment of neutrophils with prestored IL-12 during microbial infection. **J. Immunol.**, v. 165, p. 4515-4521, 2000.

BORNSTEIN, S.; THEBO, P.; ZAKRISSON, G. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serological diagnosis of canine sarcoptic mange. **Vet. Dermatol.**, v. 7, p. 21-28, 1996.

BORNSTEIN, S.; WALLGREN, P. Serodiagnosis of sarcoptic mange in pigs. **Vet. Record.** v. 141, p. 8-12, 1997.

BOYER, K. M.; REMINGTON, J. S.; MACLEOD, R. L. Toxoplasmosis. In: FEIGIN RD.; CHERRY, J. D. **Textbook of Pediatric Infections Diseases**. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. p. 2473-2490.

BURGESS, I. F. *Sarcoptes scabiei* and Scabies. **Advances in Parasitology**, v. 33, p. 235-292, 1994.

CHAO, C. C.; HU, S.; GEKKER, G.; NOVICK, W. J. JR.; REMINGTON, J. S.; PETERSON, P. K. Effects of cytokines on multiplication of *Toxoplasma gondii* in microglial cells. **J. Immunol.**, v. 15 n. 150, p. 3404-3410, 1993.

CHOBOTAR, W.; SCHOLTYSECK, E. Ultra structure. In: L. P. **The biology of the Coccidia**. Baltimore: University Park Press, 1982. p. 101-165.

CHOSIDOW, O. Scabies and pediculosis. **The Lancet.** v. 355, p. 819-826, 2000.

COL, E. B.; CANDELLO, R. A. S. **Parasitos de Camundongos de Laboratório**. Campinas. 2003. 1 CD-ROM.

COMMENS, C. We can get rid of scabies: new treatment available soon. **The Medical Journal of Australia.** v. 160, p. 317-318, 1994.

COUVERUR, J.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: CAROLINE ML., **Parasitic infections in pregnancy and the newborn**. New York: Oxford Medical Publications, 1988. p. 112-142.

DAWSON, D. V.; WHITMORE, S. P.; BRESNAHAN, J. F. Genetic control of susceptibility to mite associated ulcerative dermatitis. **Lab. Anim. Sci.**, v. 36, p. 262-267, 1986.

DECKERT-SCHLUTER, M.; RANG, A. WEINER, D.; HUANG, S.; WIESTLER, O. D.; HOF, H.; SCHLUTER, D. Interferon- γ receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. **Lab. Invest.**, v 75, p. 827-841, 1996.

DOBSON, K. J.; DAVIES, P. R. External parasites. In: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; D'Allaire, S.; Taylor, D. J. **Diseases of swine**. Wolfe Publishing. Ames. IA, 1992. p. 668-679.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice end the development of *Toxoplasma* cysts. **J. Protozool.**, v. 23, p.537-546. 1976.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KREIER JP., **Parasitic protozoa**. 3. ed. New York: Academic Press, Inc., 1977. p. 101-237.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, FL: CRC Press. 1988; p.1-220.

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. Microb. Rev.**, v.11, n. 2, p. 267-299, 1998.

FAIN, A. Etude de la variabilité de *Sarcoptes scabiei* avec une revision des Sarcoptidae. **Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia**. v. 47, p. 1-196, 1968.

FAIN, A. Epidemiological problems of scabies. **Int. J. Dermatol.**, v. 17, p. 20-30, 1978.

FELDMAN, H. A. Epidemiology of *Toxoplasma* infections. **Epidemiol. Rev.**, v. 4, p. 204-213, 1982.

FERRO, E. A.V., SILVA, D. A. O. BEVILACQUA, E., MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 7089-7094, 2002.

FLECHTMANN, C. H. W. Ácaros em produtos armazenados e na poeira domiciliar. Piracicaba: USP-SP., **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queirós**, 97 p., 1986

FLYNN, R. J. Mouse mange. **Proc. Anim. Care Panel**. v.5, p. 96-105, 1954.

FOULON, W.; NAESSENS, A.; LAWERS, S.; MEUTER, F.; AMY, J. J. Impact of primary prevention on the incidence of toxoplasmosis during pregnancy. **Obst. Gynaecol.**, v. 72, n. 3, p. 363-366, 1988.

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, p. 139-149, 1993a.

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

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; 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, p. 2533-2543, 1994.

GAZZINELLI, R. T.; AMICHAY, D.; SCHARTON-KERSTEN, T.; GRUNWALD, E.; FARBER, J. M.; SHER, A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 157, p. 798-805, 1996.

GILIOLI, R.; ANDRADE, L. A. G.; PASSOS, L. A. C. *et al.* Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Feb., v. 52, n.1, p.33-37, 2000.

GOSSELIN, E. J.; CATE, C. C.; PETTENGILL, O. S.; SORENSON, G.D. Immunocytochemistry: its evolution and criteria for its application in the study of epon-embedded cells and tissue. **Am. J. Anat.**, v. 175, n. 2-3, p. 135-160, 1986.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BATTESTI, D. M. B. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Ed. Plêiade/FAES, 2001. .32-33.

GUITÉRREZ, J. F.; MÉNDEZ DE VIGO, J. ; CASTELLÁ, J.; MUNOS, E.; FERRER, D. Prevalence of sarcoptes mange in fattening pigs sacrificed in a slaughterhouse of northeastern Spain. **Vet. Parasitol.**, v. 61, p. 145-149, 1996.

HAAS, N.; WAGEMANN, B.; HERMES, B.; HENZ, B. M.; HEILE, C.; SCHEIN, E. Crossreacting IgG antibodies against fox mite antigens in human scabies. **Arch. Dermatol. Res.** , v. 296, n.7, p. 327-331, 2005.

HAKES, T. B; ARMSTRONG, D. Toxoplasmosis. **Cancer**. v. 52, p. 1535-1540, 1983.

HAYASHI, S.; CHAN, C. C.; GAZZINELLI, R. T.; ROBERGE, G. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1476-1481, 1996.

HEUKELBACH, J.; OLIVEIRA, F. A. S.; FELDMEIER, H. Ectoparasitoses e saúde pública no Brasil: desafios para o controle. **Cad. Saúde Pública**. v. 19, n. 5 p. 1535-1540, 2003. Rio de Janeiro.

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.

ISRAELSKI, D. M.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. S423-S435, 1993.

JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Adv. Parasitol.**, v. 28, p. 55-105, 1989.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, v. 46, p. 11-21, 1960.

JACQUIER, P.; HOHLFIELD, P.; VORKAND, H.; ZUBER, P. **Epidemiologie de la toxoplasmose em Suisse: estude nationale de soroprevalence menee chez les femmes encintes em 1990-1991**. Schweiz Med. Wochenschr, v. 125, p. s29-s38, 1995. Supplement 65.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59 p. 533-547, 1995.

JUNGSMANN, P.; GUÉNET, L. J.; CAZENAVE, A. P.; COUTINHO, A.; HUERRE, M. Murine acariasis: I. Pathological and clinical evidence suggesting cutaneous allergy and wasting syndrome in BALB/c mouse. **Res. Immunol.**, v. 147, p. 27-38, 1996a.

JUNGSMANN, P.; FREITAS, A.; BANDEIRA, A.; NÓBREGA, A.; COUTINHO, A.; MARCOS, M. A.; MINOPRIO, P. Murine acariasis. II: Immunological Dysfunction and evidence for chronic activation of Th2 lymphocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 43, p. 604-612, 1996b.

KASPER, L. H.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: WARREN KS., **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. 3. ed. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1993. 610p.

KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Today**, v. 10, n. 5, p. 184-188, 1994.

KUMAR, L.; SRIDHARA, S.; SINGH, B. P.; GANGAL, S. V. Characterization of cogon grass (*Imperata cylindrica*) pollen extract and preliminary analysis of grass group 1, 4 and 5 homologues using monoclonal antibodies to *Phleum pratense*. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 117, n. 3, p. 174-179, 1998.

LANGERMANS, J. A.; VAN DER HULST, M. E. B.; NIBBERING, P. H.; HIEMSTRA, P. S.; FRANSEN, L.; VAN FURTH, R. IFN- γ induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . **J. Immunol.**, v. 148, p. 568-574, 1992.

LIESENFELD, O.; KOSEK, J.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Associação of CD4⁺ T cell-dependent, interferon- γ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 597-607, 1996.

LIESENFELD, O.; KANG, H.; PARK, D.; NGUYEN, T. A.; PARKHE, C. V.; WATANABE, H.; ABO, T.; SHER, A. REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. TNF- α , nitric oxide and IFN-gama are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically

susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.**, v. 21, n. 7, p. 365-376, 1999.

LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. G. Toxoplasmosis. **Lancet**. v. 363, p. 1965-1976, 2004.

LIESENFELD, O.; DUNAY, I. R.; ERB, K. J. Infection with *Toxoplasma gondii* reduces established and developing Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 7, p. 3812-3822, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein mensurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. AIDS commentary: Toxoplasmic encephalitis. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 1-6, 1988.

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

LUFT, B. J.; HAFNER, R.; KORZUN, A. H.; LEPORT, C.; ANTONISKIS, D.; BOSLER, E. M.; BOURLAND, D. D.; UTTAMCHANDANI, R.; FUHRER, J.; JACOBSON, J.; MORLAT, P.; VILDE, J. L.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **New Engl. J. Med.**, v. 329, p. 995–1000, 1993a.

LUFT, B. J.; HAFNER, R.; KORZUN, A. H.; LEPORT, C.; ANTONISKIS, D. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency. **New Engl. J. Med.**, v. 329, p. 995–1000, 1993b.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: ATHENEU, 2001. p. 289- 310.

MARSHALL, A. J.; BRUNET, L. R.; VAN GESSEL, Y.; ALCARAZ, A.; BLISS, S. K.; PEARCE, E. J.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* synergize to promote hepatocyte dysfunction associated with high levels of plasma TNF- α and early death in C57BL/6 mice. **J. Immunol.**, v. 163, p. 2089-2097, 1999.

MAYRYL, S. I.; ZUBERIL, B. A.; LIU, F. T. Role of Immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 36, p. 821-827, 2003.

MCLEOD, R.; EISENHAUER, P; MACK, D.; BROWN, C.; FILICE, G.; SPITALNY, G. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 142, p. 3247- 1353,1989.

MELHORN, H.; FRENKEL, J. K. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. **J. Parasitol.**, v. 66, p. 59-67 , 1980.

MELLANBY, K. The development of symptoms, parasitic infection and immunity in human scabies. **Parasitol.**, v. 35, p. 197-206, 1944.

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves majos surface protein SAG-1 (P30). **Exp. Parasitol.**, v. 79, p. 11-20, 1994.

MORITA, E.; KANEKO, S.; HIRAGUN, T.; SHINDO, H.; TANAKA, T.; FURUKAWA, T.; NOBUKIYO, A.; YAMAMOTO, S. Fur mites induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mice, NC/Kuj. **J. Dermatol. Sci.** v. 19, p. 37-43, 1999.

MORRISSETTE, N. S.; ROSS, D. S. *Toxoplasma gondii* : a family of apical antigens associated with the cytoskeleton. **Exp. Parasitol.**, v. 89, p. 296-303, 1998.

MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 01, p. 21-38, 2002.

NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; WIEBE, M. E.; RUBIN, B. Y. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, v. 158, p. 670, 689, 1983.

NOVIANA, D.; HARJANTI, D. W.; OTSUKA, Y, HORII, Y. Proliferation of protease-enriched mast cells in Sarcoptic skin lesions of Roccoon dogs. **J. Comp. Path.**, v. 131, p. 28-37, 2004.

PARISH, L. C.; MILLIKAN, L. E.; WITKOWSKI, J. A.; SCHWARTZMAN, R. Scabies in the extended care facility. **Int. J. Dermatol.**, v. 22, p. 380-382, 1983.

PFEFFERKORN, E. R. Interferon- γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 908-912, 1984.

REILLY, S.; CULLEN, D.; DAVIES, M. G. An outbreak of scabies in a hospital and community. **Br. Med. J.**, v. 291, p. 1031-1032, 1984.

REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R. N.; SHER, A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution to T cell areas. **J. Exp. Med.**, v. 186, p. 1819-1829, 1997.

REMINGTON, J. S.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON JS.; KLEIN JO., **Infections diseases of the fetus and newborn infant**. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995. p. 140-263.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A., 2001. 713 p.

SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; BAMBIRRA, E. A.; FARIA, A. M. C.; AFONSO, L. C. C.; VIEIRA, L. Q.; GAZZINELLI, R. T. Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 44939-4944, 1999.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; WYNN, T. A.; DENKERS, E. Y.; BALA, S.; SHOWE, L.; GRUNVALD, E.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. In the absence of endogenous IFN- γ mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. **J. Immunol.**, v. 157, p. 4045-4054, 1996.

SCHARTON-KERSTEN, T.; YAP, G.; MAGRAM, J.; SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen of *Toxoplasma gondii*. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1-13, 1997.

SCHLUTER, S. D.; KAEFER, N.; HOF, H.; WIESTLER, O. D.; DECKERT-SCHLUTER, M. Expression pattern and cellular origin of cytokines in the normal and *Toxoplasma gondii*-infected murine brains. **Am. J. Pathol.**, v. 150, n. 3, p. 1021-1035, 1997.

SCHLUTER, S. D.; DECKERT-SCHLUTER, M.; LORENZ, E.; MEYER, T.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactive the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. **J. Immunol.**, v. 15, n. 162, p. 3212-3218, 1999.

SCHOFFEL, I.; SCHEIN, E.; WITTSTADT, U.; HENTSCHE, J. Zur Parasitenfauna des Rotfuchses in Berlin (West). **Berl Munch Tierarztl Wochenschr** . v. 104, p. 153–157, 1991.

SCHUSTER, R.; WANJEK, C.; BARTNIK, C.; WITTSTADT, U.; BAUMANN, M.; SCHEIN, E. Leberegelbefall und Räude beim Rotfuchs in Berlin. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**. v. 114, p. 193–196, 2001.

SHARMA, S. D. Immunology of toxoplasmosis. In: WYLER DJ. **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects**. New York: W. H. Freeman, 1990.

SHI, S. R.; KEY, M. E.; KALRA, K. L.; Antigen retrieval in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J. Histochem, Cytochem.**, v. 39, n. 6, p.741-748, 1991.

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F. L.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, p.859-868, 2002.

STOKKERMANS, T. J.; SCHWARTZMAN, J. D.; KEENAN, K.; MORRISSETTE, N. S.; TILNEY, L. G.; ROOS, D. S. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. **Exp. Parasitol.**, v. 84, p. 355-370, 1996.

STOICOV, C.; WHARY, M.; ROGERS, A. B.; LEE, F. S.; KLUCEVSEK, K.; LI, H.; CAI, X.; SAFFARI, R.; GE, Z.; KHAN, I. A.; COMBE, C.; LUSTER, A.; FOX, J. G.; HOUGHTON, J. Coinfection modulates inflammatory responses and clinical outcome pf *Helicobacter felis* and *Toxoplasma gondii* infections. **J. Immunol.**, v. 173, p. 3329-3336, 2004.

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

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

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

WALTON, S. F.; HOLT, D. C.; CURRIE, B. J.; KEMP, D. J. Scabies: new future for a neglected disease. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 309-376, 2004.

WEISBROTH, S. H. *Myocoptes musculinus* (Koch). In: FOSTER, H. L.; SMALL, J. D.; FOX, J. G. **The mouse in biomedical research**. Academic Press, New York, II. P 397-398, 1982a. 1982 a.

WEISBROTH, S. H. *Myobia musculi* (Schränk). In: FOSTER, H. L.; SMALL, J. D.; FOX, J. G. **The mouse in biomedical research**. Academic Press, New York, II. P 390-397, 1982b.

WILCKE, T, HEUKELBACH, J.; SABÓIA-MOURA, R. C., FELDMEIER, H. Scabies, pediculosis, tungiasis and cutaneous larva migrans in a poor community in northeast Brazil. **Acta Tropica**, 83 (sup.1):S100. 2002.

ZUBER, P.; JAQUIER, P. **Epidemiology of toxoplasmosis worldwide status**. Schweiz Med. Wochenschr, v. 65, p. s19-s22, 1995.