

Ricardo Luiz Dalla Zanna

**Estudo da resposta imune celular e humoral
desencadeada por *Toxoplasma gondii* em
camundongos A/Sn imunossuprimidos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola

SÃO PAULO

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Zanna, Ricardo Luiz Dalla.

Estudo da resposta imune celular e humoral desencadeada por *Toxoplasma gondii* em camundongos A/Sn imunossuprimidos. – 2017.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde.

Orientação: Prof. Dr. Vera Lucia Pereira Chioccola

1. *Toxoplasma Gondii*. 2. Imunidade Celular. 3. Imunidade Humoral. 4. Antígenos. 5. Anticorpos. 6. Dexametasona.

SES/CCD/CD-361/2017

Dedico este trabalho à minha amada esposa, Juliana Quero Reimão Dalla Zanna, por todo incentivo, compreensão, apoio incondicional, amizade e amor. Minha gratidão e admiração jamais caberão em palavras. Sabemos o quanto é difícil atingirmos nossos objetivos e a conclusão deste trabalho é mais um que batalhamos em parceria, colocando, acima de tudo, o bem-estar de nossa família, especialmente dos nossos filhos, Benjamin Reimão Dalla Zanna e nosso segundo menino que está a caminho.

O dever daquele que busca a verdade ao investigar um trabalho científico é o de se tornar inimigo daquilo que se está lendo e atacar seu objeto de leitura por todos os lados. Deve-se também suspeitar de si mesmo quando se está avaliando criticamente um trabalho, pois só assim é possível evitar prejuízo ou leniência.

Hasan Ibn al-Haytham (Alhazen)(965 – 1040)

Agradecimentos

À Profª Drª Vera Lucia Pereira Chioccola, por ser minha orientadora e ter se dedicado, com muito empenho, paciência e compreensão, desde o início do desenvolvimento deste estudo até a conclusão. Muito obrigado por estar ao meu lado e me ajudado a concluir esta etapa de minha vida profissional.

À Profª Drª Maria de Fátima Costa Pires, por toda assistência, compreensão e paciência. Obrigado pelos conselhos profissionais, por toda ajuda e incentivo.

Ao Profº Dr. André Gustavo Tempone, por toda ajuda, apoio moral e incentivo. Pela amizade e preocupação constante comigo e com minha família.

À Tirces Francine Guilherme Martins, pela ajuda imprescindível em diversas etapas do curso. Certamente sem a ajuda de seu trabalho impecável eu teria muito mais dificuldades em resolver questões de ordem administrativas junto à Pós-Graduação.

Aos integrantes das bancas de qualificação e defesa, Profº Dr. José Eduardo Tolezano, Profº Dr. Adriano Cappellazzo Coelho, Profª Drª. Mariane Barroso Pereira e Drª Thais Alves da Costa Silva, pelas sugestões e críticas construtivas oferecidas para o enriquecimento deste estudo.

Ao Profº Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, pela amizade, conselhos pessoais e profissionais, ensinamentos e bate papos excepcionais.

Ao Profº Dr. Douglas Mascara, meu orientador durante a graduação e amigo, que, apesar da distância e dos contatos eventuais, sempre me aconselhou, direcionou e torceu por mim. Agradeço por me ensinar os primeiros passos na carreira acadêmica, por acompanhar meu desenvolvimento e por ser fonte de inspiração.

Aos funcionários, aprimorandos e pós-graduandos das seções de Parasitoses Sistêmicas, Enteroparasitoses e Micologia do 8º andar do Instituto Adolfo Lutz, pelas assistências, conversas, cafés e companheirismo.

Aos amigos de laboratório, meu agradecimento especial, por toda ajuda e amizade – Ricardo, Lásaro, Kate, Jefferson, Cris, Thais, Gabi, Inara, Martinha, Luiz, Lilian, Valéria e Daíse.

Ao meu pai, Hugo e minhas mães Ana e Catia, por terem me educado, por torcerem por mim, me incentivarem, se preocuparem e, acima de tudo, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem independentemente da situação. Tenho muito amor e gratidão por vocês.

Às minhas irmãs Mariana e Marcia, por serem exemplo de luta e superação. Por sempre torcerem por mim. Ao meu cunhado, Antônio, por ser um grande conselheiro e incentivador. Aos meus sobrinhos, por me mostrarem que a vida precisa de brincadeiras e descontração.

Meu agradecimento e homenagem à minha amiga-irmã e bióloga, Juliana Montovani (*in memorium*), por sempre ter me incentivado; por sempre ter deixado claro sua admiração pela nossa profissão e por minha evolução na carreira. Por sempre ter sido minha amiga e companheira, desde quando nascemos. Sua ausência é sentida diariamente.

Agradeço especialmente minha esposa, Juliana Quero Reimão Dalla Zanna, por tudo. Por ser exemplo de profissional; ser excelente pesquisadora; ser excepcional professora. Todas essas qualidades profissionais resultaram na conclusão deste trabalho. Sem sua orientação, colaboração e dedicação não haveria conseguido. Sua parceria foi de suma importância e tenho muita sorte de ter você na minha vida. Agradeço poder dividir os dias com você, por você ser minha amiga, minha amada esposa e por nossa família. Tudo que conquistei foi com sua ajuda. Amo você para sempre.

Agradeço especialmente aos meus filhos, Benjamin Reimão Dalla Zanna e seu irmão (5° mês de gestação), por terem me tornado pai e, com isso, uma pessoa melhor. Agradeço a vocês por enriquecerem minha vida com felicidade, simplicidade, amor, carinho e entrega. Vocês são a razão da minha vida.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2011/13939-8).

Ricardo Luiz Dalla Zanna teve apoio financeiro da CAPES.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular com alta prevalência em humanos. Em indivíduos imunocomprometidos a infecção é reativada em estados mais severos da doença, como a toxoplasmose cerebral. As vias de ação da resposta imune não estão totalmente esclarecidas, especialmente em modelos experimentais imunossuprimidos. No presente estudo, foi estabelecido um modelo experimental de toxoplasmose em animais imunossuprimidos empregando-se camundongos A/Sn fêmeas infectadas com 10 cistos da cepa ME 49 de *T. gondii*. O tratamento imunossupressor foi iniciado 30 dias após o inóculo parasitário e foi constituído da administração subcutânea de Ciclosporina A (CsA) ou de Dexametasona (Dex) diluída em água destilada acondicionada em bebedouros distribuídos em gaiolas. CsA e Dex induziram imunossupressão significativa ($p < 0.05$) e subsequente reativação do parasita em animais infectados. Por meio da contagem de leucócitos, observou-se que o efeito imunossupressor da Dex foi superior à CsA. A avaliação dos padrões de resposta imune celular e humoral foi realizada com o uso de Dex, via oral, na concentração de 10 mg/L, em camundongos A/Sn fêmeas pelo período de 7 a 56 dias de tratamento. Os camundongos imunossuprimidos por Dex apresentaram redução significativa ($p < 0.05$) na dosagem de citocinas Interleucina 5 (IL-5), Interleucina 10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interferon γ (IFN- γ). Os camundongos imunossuprimidos por Dex apresentaram níveis de anticorpos reduzidos quando analisados frente aos Antígenos Lisados de Taquizoítos (ALT), no entanto, quando analisados em relação aos Antígenos Excretados e Secretados (ESA), apresentaram aumento da concentração de anticorpos. O perfil de anticorpos e citocinas nesses animais sugeriu uma tendência da resposta celular do tipo Th2 em relação à resposta celular do tipo Th1. Os resultados indicaram que o modelo murino de imunossupressão por Dex desenvolvido no presente trabalho mostrou-se útil para a investigação da resposta imune celular e humoral frente à infecção por *T. gondii* e este modelo poderá ser aplicado em futuros experimentos que visem à compreensão da relação parasito-hospedeiro.

PALAVRAS CHAVE: *Toxoplasma gondii*, Imunidade celular, Imunidade humoral, Antígenos, Anticorpos, Dexametasona.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan with high prevalence in humans. In immunocompromised individuals the infection is reactivated in more severe states of the disease, such as cerebral toxoplasmosis. The pathways of action of the immune response are not fully understood, especially in immunosuppressed experimental models. In the present study, an experimental model of toxoplasmosis was established in immunosuppressed animals using female A/Sn mice infected with 10 cysts of *T. gondii* ME49 strain. Immunosuppressive treatment was initiated 30 days after the parasitic inoculum and consisted of the subcutaneous administration of Cyclosporin A (CsA) or Dexamethasone (Dex) diluted in distilled water conditioned in cage flasks. CsA and Dex induced significant immunosuppression ($p < 0.05$) and subsequent reactivation of the parasite in infected animals. By means of the leukocyte count, it was observed that the immunosuppressive effect of Dex was higher than CsA. The evaluation of the cellular and humoral immune response patterns was performed using oral Dex at 10 mg/L in female A/Sn mice for 7 to 56 days of treatment. Dex-immunosuppressed mice showed a significant ($p < 0.05$) reduction in the cytokines dosage of Interleukin 5 (IL-5), Interleukin 10 (IL-10), Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) and Interferon γ (IFN- γ). Mice immunized with Dex showed reduced antibody levels when analyzed against Tachyzoite Lysed Antigens (TLA); however, when analyzed for Excreted/Secreted Antigens (ESA), they showed an increase in the concentration of antibodies. The antibody and cytokine profile in these animals suggested a trend of Th2-type cellular response over the Th1-type cellular response. The results indicated that the murine model of Dex immunosuppression developed in the present study was useful for investigating the cellular and humoral immune response to *T. gondii* infection and this model can be applied in future experiments aiming to understand the relationship between host and parasite.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*, Cell immunity, Humoral immunity, Antigens, Antibodies, Dexamethasone.

Lista de abreviaturas e siglas

Aids: *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

ATL: antígenos de taquizoítos lisados

CD4+: *cluster of differentiation* (Grupamento de diferenciação 4)

CD8+: *cluster of differentiation* (Grupamento de diferenciação 8)

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

ConA: concanavalina A

CsA: ciclosporina A

D.O.: densidade óptica

Dex: dexametasona

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)

ESA: *Excreted/secreted antigens* (antígenos excretados/secretados)

HIV: *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

IAL: Instituto Adolfo Lutz

IFN γ : interferon gama

IgA: imunoglobulina da classe A

IgE: imunoglobulina da classe E

IgG: imunoglobulina da classe G

IgM: imunoglobulina da classe M

IL: interleucina

I: grupo de camundongos A/Sn infectado com *T. gondii*/ cepa ME 49

I/T_{CsA}: camundongo A/Sn infectado com *T. gondii* cepa ME 49 tratado com Ciclosporina A

I/T_{Dex}: camundongo A/Sn infectado com *T. gondii* cepa ME 49 tratado com Dexametasona

kDa: quilodalton

M: molar

mg: miligrama

MHC: complexo de histocompatibilidade principal

mL: mililitro

mRNA: RNA mensageiro

NT: camundongo A/Sn não infectado não tratado

NI/T_{CsA}: camundongo A/Sn não infectado tratado com Ciclosporina A

NI/T_{Dex}: camundongo A/Sn não infectado tratado com Dexametasona

NK: *Natural Killer*

OPD: orto-fenilenodiamina

pb: pares de base

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH: concentração de hidrogênio iônico

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SFB: soro fetal bovino

Th1: resposta celular do tipo 1

Th2: resposta celular do tipo 2

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UV: ultravioleta

VERO: células de rim de macaco verde africano

μ L: microlitro

μ M: micromolar

Lista de tabelas e figuras

- Tabela 1:** Descrição dos grupos de camundongos A/Sn utilizados na padronização da contagem de leucócitos em tratamento imunossupressor por Ciclosporina A.46
- Tabela 2:** Descrição dos grupos de camundongos A/Sn utilizados nos experimentos com Ciclosporina A47
- Tabela 3:** Descrição dos grupos de camundongos A/Sn utilizados nos experimentos com Dexametasona.....48
- Tabela 4:** Resultados de cPCR de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*.....60
- Tabela 5:** Valores obtidos de limite de detecção para dosagem de citocinas por ELISA.63
- Figura 1:** Taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.....23
- Figura 2:** Formas de vida infectantes de *Toxoplasma gondii*. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, corados com Giemsa, de um esfregaço de fluido peritoneal obtido a partir de um camundongo infectado (A), cisto cerebral não corado, obtido a partir de um camundongo infectado (B) e oocisto esporulado, visto sob microscopia de contraste.....24
- Figura 3:** Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. A replicação sexual ocorre apenas no intestino do gato, resultando na liberação de oocistos diplóides que irão sofrer esporogonia no ambiente, para obtenção de esporozoítos. Os oocistos dão origem à infecção em uma variedade de hospedeiros intermediários. Durante a infecção aguda, ocorre a proliferação rápida de

taquizoítos que se difundem no interior do hospedeiro. Cistos teciduais contendo bradizoítos dão origem a uma infecção de longo prazo e são transmitidos assexuadamente após a ingestão por via oral a uma variedade de hospedeiros.....26

Figura 4: Fórmula estrutural da Ciclosporina A.39

Figura 5: Estrutura química da Dexametasona.40

Figura 6: Representação esquemática dos procedimentos realizados para manutenção de *Toxoplasma gondii* cepa RH.....44

Figura 7: Representação esquemática dos procedimentos realizados para manutenção de *Toxoplasma gondii* cepa ME 49.....45

Figura 8: Representação esquemática dos procedimentos realizados com o imunossupressor Ciclosporina (CsA). NI: Não Infectado; NI/T_{CsA}: Não Infectado/Tratado com CsA; I: Infectado com *Toxoplasma gondii*; I/T_{CsA}: Infectado com *Toxoplasma gondii*/Tratado com CsA.46

Figura 9: Esquema dos procedimentos realizados com o imunossupressor Dex.: NI: Não infectado; I: Infectado com *Toxoplasma gondii* e I/T_{Dex}: Infectado com *Toxoplasma gondii*/Tratado com Dex.....48

Figura 10: Representação esquemática da contagem de leucócitos em camundongos A/Sn fêmeas dos grupos Não Infectado (NI) e Infectado (I) com *Toxoplasma gondii*.....49

Figura 11: Representação esquemática dos procedimentos realizados para obtenção dos antígenos avaliados. ATL (Antígenos de Taquizoítos Lisados); ESA (*Excreted/Secreted Antigens*).....52

Figura 12: Contagem de leucócitos de amostras de sangue dos camundongos dos grupos NI (não infectado) e I (infectado com *Toxoplasma gondii*) (n=10/grupo). As contagens do número de leucócitos/mL de sangue periférico foram feitas em câmara de Neubauer. Não foi observada diferença estatística entre ambos grupos.....57

Figura 13: Contagem de leucócitos de amostras de sangue de camundongos do grupo NI (não infectado) e camundongos do grupo I/T_{CsA503x} (infectados e tratados com CsA). As contagens de sangue periférico foram feitas em câmara de Neubauer. Não foi observada diferença estatística entre ambos.....58

Figura 14: Contagem de leucócitos de amostras de sangue de camundongos tratados com CsA. A contagem de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Os dados apresentados foram obtidos calculando-se a média (\pm DP) de cada grupo de animais. * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NI/T_{CsA10/3x} ($p < 0,005$).....59

Figura 15: Porcentagens de imunossupressão por CsA em camundongos A/Sn. As porcentagens foram calculadas com base no valor do número de leucócitos/mL do grupo NI ($9,3 \times 10^6$ leucócitos/mL), e apresentou diferença estatisticamente significativa (* $p < 0,005$).....59

Figura 16: Contagem de leucócitos de amostras de sangue de camundongos infectados por *Toxoplasma gondii* 30 dias pós-infecção e tratados com Dex (10mg/L). A contagem de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Os dados apresentados foram obtidos calculando-se a média \pm DP por grupo. * diferença estatisticamente significativa a $p < 0,0001$61

Figura 17: Porcentagem de sobrevivência de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex

(10mg/L). A porcentagem de sobrevivência após 8 semanas de tratamento foi de 83,33%.....62

Figura 18: Regressões lineares obtidas a partir de diluições seriadas das citocinas e os respectivos valores de densidade óptica (D.O.) obtidos após leitura em leitor de placas no comprimento de onda de 450 nm. IL-5 (A), IL-10 (B), TNF- α (C) e IFN- γ (D). O valor de correlação linear (r^2) foi indicado em cada gráfico.....63

Figura 19: Concentração de IL-5 de esplenócitos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). Os esplenócitos foram estimulados com ATL (A) e ESA (B). A linha tracejada indica o limite de detecção mínimo. Os símbolos * e # indicam significância estatística em relação ao grupo I. * $p < 0,001$; # $p < 0,05$ respectivamente.....65

Figura 20: Concentração de IL-10 de esplenócitos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). Os esplenócitos foram estimulados com ATL (A) e ESA (B). A linha tracejada indica o limite de detecção mínimo. Os símbolos * e # indicam significância estatística em relação ao grupo I. * $p < 0,0001$; # $p < 0,001$ respectivamente.....66

Figura 21: Concentração de TNF- α de esplenócitos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). Os esplenócitos foram estimulados com ATL (A) e ESA (B). A linha tracejada indica o limite de detecção mínimo. O símbolo * indica significância estatística em relação ao grupo I. * $p < 0,001$67

Figura 22: Concentração de IFN- γ de esplenócitos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). Os esplenócitos foram estimulados com ATL (A) e ESA

(B). A linha tracejada indica o limite de detecção mínimo. O símbolo * indica significância estatística em relação ao grupo I. * $p > 0,001$68

Figura 23: Níveis de anticorpos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). As dosagens foram feitas por ELISA utilizando-se ATL como antígeno.....69

Figura 24: Níveis de anticorpos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). As dosagens foram feitas por ELISA utilizando-se ESA como antígeno.....71

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Histórico das observações clínicas sobre <i>Toxoplasma gondii</i>	19
1.2. Biologia	22
1.3. Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	24
1.4. Distribuição geográfica da toxoplasmose.....	26
1.5. Características clínicas da toxoplasmose no em humanos.....	28
1.5.1. Patogênese e desenvolvimento da resposta imune durante o curso da infecção.....	28
1.5.2. Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes.....	32
1.5.3. Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos.....	33
1.5.3.1. Reativação da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	34
1.5.4. Toxoplasmose congênita.....	35
1.6. Modelos murinos de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	36
1.7. Agentes imunossupressores.....	38
1.7.1. Ciclosporina A (CsA).....	39
1.7.2. Dexametasona (Dex).....	40
1.8. Justificativa	41
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo Geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. Aspectos éticos	43
3.2. Animais experimentais	43
3.3. Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	43
3.3.1. Manutenção de cepas RH para produção de antígenos..	44
3.3.2. Manutenção de cepas ME 49 par infecção.....	45
3.4. Padronizações da escolha do tratamento com imunossupressores.....	46

3.4.1. Grupos experimentais tratados com Ciclosporina A (CsA).....	46
3.4.2. Grupos experimentais tratados com Dexametasona (Dex).....	47
3.5. Padronização dos métodos diagnósticos.....	49
3.5.1. Contagem de leucócitos.....	49
3.5.2. Extração de DNA e PCR.....	49
3.6. Infecção de células VERO com <i>Toxoplasma gondii</i>	50
3.7. Produção de antígenos ESA.....	51
3.8. Produção de antígenos ATL.....	51
3.9. Obtenção de linfócitos e ensaios de linfoproliferação.....	52
3.10. Dosagem de citocinas.....	53
3.11. Dosagem de IgM, IgG, IgG1 e IgG2a.....	54
3.12. Análise de dados	55
4. RESULTADOS	56
4.1. Padronizações dos métodos diagnósticos.....	56
4.1.1. Diagnóstico molecular dos camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i>	56
4.1.2. Contagem de leucócitos	56
4.2. Padronizações para a escolha do tratamento com os fármacos imunossupressores.....	57
4.2.1. Tratamento com Ciclosporina A (CsA).....	57
4.2.1.1. Contagem de leucócitos nos grupos NI e I/T _{CsA50/3x}	57
4.2.1.2. Determinação da dose de Ciclosporina A (CsA).....	58
4.2.2. Tratamento com Dexametasona (Dex).....	60
4.2.2.1. Contagem de Leucócitos	60
4.2.2.2. Porcentagem de Sobrevivência	61
4.3. Dosagem dos níveis de citocinas.....	62
4.3.1. Determinação de limites de detecção das citocinas.....	62

4.3.2. Níveis de citocinas em animais imunossuprimidos.....	64
4.3.2.1. Interleucina 5 (IL-5).....	64
4.3.2.2. Interleucina 10 (IL-10).....	65
4.3.2.3. Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α).....	66
4.3.2.4. Interferon γ (IFN γ).....	67
4.4. Níveis de anticorpos e subclasses nos animais imunossuprimidos.....	68
4.4.1. Dosagem de anticorpos por ELISA/ATL.....	68
4.4.2. Dosagem de anticorpos por ELISA/ESA.....	70
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

Em 2018 comemora-se 110 anos da descrição de *Toxoplasma gondii*. Em 1908, no Instituto Pasteur da Tunísia, os pesquisadores Nicolle e Manceaux encontraram um protozoário em tecidos de um roedor norte-africano utilizado para pesquisas sobre leishmaniose, o *Ctenodactylus gundi*. Em 1909 nomearam o protozoário de acordo com sua morfologia (*tox*o = arco, *plasma* = vida) e seu hospedeiro. Dubey (2010) em seu livro comenta que, o nome correto deveria ser *Toxoplasma gundii*, pois os pesquisadores franceses identificaram erroneamente o hospedeiro roedor (*Ctenodactylus gundi*). Também em 1908, Splendore descobriu, no Brasil, o mesmo protozoário parasitando um coelho de laboratório e o descreveu como “um novo protozoário que recorda *Leishmania* spp. do homem”.

A infecção pelo protozoário parasita *T. gondii* tem uma distribuição mundial. Este parasita intracelular obrigatório pode infectar humanos, bem como praticamente todos os animais de sangue quente, incluindo mamíferos e aves. Desde a sua primeira descrição no roedor, o parasita foi progressivamente reconhecido como agente de uma zoonose generalizada. No entanto, todo o seu ciclo de vida foi definitivamente compreendido apenas no final da década de 1960 (Dubey e Frenkel, 1972), com a descoberta do papel central do gato como hospedeiro definitivo que abriga o ciclo parasitário sexual e a propagação de oocistos através das fezes. No mesmo período, o parasito foi classificado na subclasse coccidiana (Frenkel, Dubey e Miller, 1970), no Filo Apicomplexa; e a infectividade das três formas de vida parasitárias (taquizoíto, cisto e oocisto) foi bem caracterizada.

1.1. Histórico das observações clínicas sobre *Toxoplasma gondii*

Se passaram cerca de 25 anos desde os relatos iniciais dos possíveis casos de toxoplasmose em seres humanos até que o *T. gondii* fosse claramente estabelecido como um patógeno humano (conforme revisado por

Weiss e Dubey, 2009). Castellani (1914) foi provavelmente o primeiro a descrever um parasita parecido com *T. gondii* em esfregaços sanguíneos de um garoto de 14 anos que foi a óbito por uma doença caracterizada por anemia grave e febre. Fedorovitch (1916) observou organismos semelhantes aos relatados por Castellani no sangue de um menino de 10 anos de uma região do Mar Negro que também apresentava anemia e febre. Chalmers e Kamar (1920) relataram organismos semelhantes em um soldado no Sudão que apresentavam dor de cabeça crônica, febre e diarreia. Estes casos, no entanto, foram incompletamente estudados e é possível que estes casos fossem causados por *Leishmania* spp. Em 1923, Janků informou sobre uma criança de 11 meses de idade que sofreu enorme hidrocefalia e coriorretinite e foi a óbito (Janků, 1923). A revisão deste caso demonstra claramente que a criança desenvolveu toxoplasmose congênita grave.

Torres (1927) descreveu um caso semelhante em uma criança do Brasil que morreu com convulsões aos dois dias de idade. Embora Janků se referisse apenas a seus organismos como Sporozoa e Torres como *Encephalitozoon chagasi*, Levaditi (1928) sugeriu que ambos os casos eram devidos a *T. gondii*. Coulon (1929) observou parasitas no fluido espinhal de um menino de 17 anos que foi a óbito devido à meningite, os quais ele chamou de *E. brumpti*. Wolf e Cowen (1937) descreveram um parasita, que chamaram de *E. hominis*, no sistema nervoso e retina de uma criança com encefalite, coriorretinite e hidrocefalia. Como apontado por Sabin em 1937, este parasita era indistinguível de *T. gondii* (Sabin, 1942). A causa da confusão na identificação deste organismo no tecido foi a sua ligeira diferença na aparência em espécimes histológicos fixos em comparação com esfregaços de culturas ou fluidos peritoneais de animais infectados experimentalmente.

Em 1939, Wolf, Cowen e Paige foram os primeiros a identificar de forma conclusiva *T. gondii* como causa da doença humana (Wolf et al., 1939). O paciente descrito foi uma criança nascida em, Nova York. Após o parto, aos três dias de idade, esta criança desenvolveu convulsões e coriorretinite em ambos os olhos. A criança foi a óbito com um mês de idade e a autópsia demonstrou *T. gondii* livres e intracelulares em amostras de encéfalo e retina. Essas amostras foram inoculadas intracerebralmente em coelhos e camundongos e esses animais desenvolveram encefalite, a partir da qual *T.*

gondii foi isolado. Estudos realizados por Sabin demonstraram que este isolado humano não era nem biologicamente nem imunologicamente diferente dos isolados obtidos a partir de outros animais. Paige, Cowen e Wolf revisaram em detalhes seus próprios casos e os relatados por outros, de encefalomielite e coriorretinite em lactentes e concluiu-se que esta era uma síndrome humana causada por *T. gondii* (Paige, Cowen e Wolf, 1942).

O desenvolvimento de um teste sorológico em 1948 por Albert Sabin e Harry Feldman foi um grande avanço no estudo da toxoplasmose (Sabin e Feldman, 1948). Este teste é sensível e específico, sem evidências de resultados falsos em seres humanos. A capacidade de identificar infecções por *T. gondii* com base neste teste sorológico permitiu estudos epidemiológicos sobre a incidência de infecção, demonstrando a prevalência generalizada desta infecção em humanos. Também demonstrou que os sinais clínicos de toxoplasmose congênita clínica ocorrem em outras doenças e ajudaram no diagnóstico diferencial de infecções congênitas (Sabin e Feldman, 1949; Feldman e Miller, 1957).

O tratamento da toxoplasmose ocular com drogas antimicrobianas começou no início da década de 1950. Em 1953, Eyles e Coleman demonstraram o uso de pirimetamina e sulfonamidas (Eyles, 1953), que continua a ser o padrão-ouro para a terapia anti-*Toxoplasma*. Atualmente, a terapia para a toxoplasmose ocular geralmente é administrada somente se houver reativação da infecção, pois os medicamentos atuais não têm efeito sobre formas latentes deste parasita. Os medicamentos mais comumente utilizados no tratamento da uveíte é a pirimetamina, sulfadiazina, prednisona e ácido fólico (Engstrom et al., 1991).

A encefalite devido a *T. gondii* em pacientes imuno-comprometidos foi relatada pela primeira vez em pacientes com doença de Hodgkin durante o tratamento imunossupressor (Flament-Durand et al., 1967). Foi, no entanto, uma infecção raramente vista antes do surgimento da Aids em adultos na década de 1980. Luft e colaboradores (1983) relataram uma série de pacientes com encefalite por *T. gondii*. Essa infecção é geralmente fatal quando não tratada e ocorre como resultado da reativação da infecção crônica relacionada ao defeito na imunidade das células T induzida pela infecção pelo HIV. Esta infecção foi uma das complicações neurológicas mais comuns da Aids antes do

advento da terapia anti-retroviral. Com a reconstituição imune esta infecção não é vista; no entanto, ainda é um problema em áreas onde o tratamento contra o HIV não está disponível (Weiss e Dubey, 2009).

A toxoplasmose é uma zoonose mundial com infecções assintomáticas na maioria dos humanos imunocompetentes adultos. O motivo pelo qual algumas pessoas infectadas com *T. gondii* desenvolvem sintomas e podem até ir a óbito não são completamente compreendidos. Em 2009, na Guiana Francesa, adultos imunocompetentes morreram de toxoplasmose (Carme et al., 2009). No Brasil, uma maior proporção de crianças infectadas pela via congênita desenvolveu doença grave e observou-se que o início dos sintomas clínicos foi anterior a outros casos relatados no resto do mundo (Dubey et al., 2012). A interação entre parasito e hospedeiro desempenha um papel importante neste cenário. Além disso, a hipótese de que as cepas de *T. gondii* envolvidas podem influenciar a gravidade da toxoplasmose (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Estudos recentes indicam que as cepas de *T. gondii* oriundas da América do Sul são fenotípicas e geneticamente diferentes daquelas oriundas da Europa e América do Norte (Su et al., 2012; Shwab et al., 2014).

1.2. Biologia

T. gondii possui três formas de vida infectantes: o taquizoíto invasivo, que se divide rapidamente, o bradizoíto, que se divide lentamente em cistos teciduais, e um estágio ambiental, o esporozoíto, protegido dentro de um oocisto. Os taquizoítos são células infectivas em forma de lua crescente, com aproximadamente 5 μm de comprimento e 2 μm de largura, com uma extremidade apical pontiaguda e uma extremidade posterior arredondada. Elas são limitadas por uma membrana complexa, chamada de película, intimamente associada a um citoesqueleto envolvido na integridade estrutural e motilidade da célula. Possuem um núcleo, uma mitocôndria, um complexo de Golgi, ribossomos, um retículo endoplasmático e um plastídio, composto por múltiplas membranas, chamada apicoplasto, resultado de uma possível aquisição pelo parasita através de uma endossimbiose a partir de uma alga vermelha de vida livre (Roos, et al. 1999). De forma semelhante aos demais membros do filo

Apicomplexa, eles concentram na sua parte apical uma estrutura do citoesqueleto especializada (o conóide) e numerosas organelas secretoras (roptrias, grânulos densos e micronemas) (Dubey, Lindsay e Speer, 1998) (Figura 1).

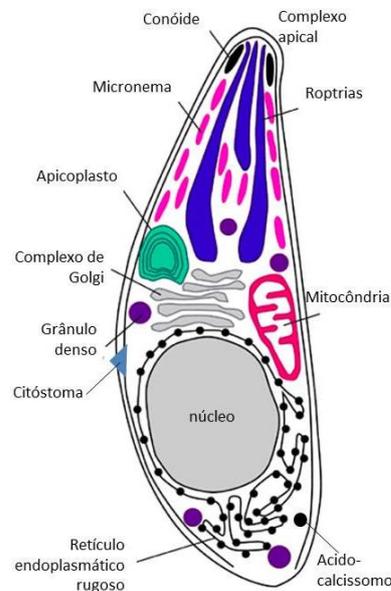


Figura 1: Taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. Obtido de Ajioka, Fitzpatrick e Reitter (2001) e adaptado por Reimão, JQ e Zanna, RDZ.

Os taquizoítos são a forma de disseminação (Figura 2 A). Eles são capazes de invadir praticamente todos os tipos de células dos vertebrados, onde se multiplicam em um vacúolo parasitóforo (Ajioka et al., 2001).

Os bradizoítos resultam da conversão de taquizoítos em um estágio de divisão lenta e formam cistos teciduais (Figura 2 B). Estes cistos são mais ou menos esféricos em células cerebrais ou alongados em células musculares. Eles variam em tamanho de 10 μm (cistos mais jovens, contendo apenas dois bradizoítos), até 100 μm (cistos mais velhos, contendo centenas ou milhares de bradizoítos densamente embalados). A parede do cisto consiste em uma membrana limitante que apresenta numerosas invaginações e uma camada subjacente de material granular denso de elétrons (Ferguson, 2004). Os bradizoítos têm um metabolismo latente, bem adaptado à sobrevivência à longo prazo. Os cistos permanecem intracelulares ao longo de sua vida útil. A morte da célula hospedeira pode desencadear a ruptura da parede do cisto e a

consequente liberação de bradizoítos. A resistência dos bradizoítos à pepsina ácida (sobrevivência de 1 a 2 horas em pepsina-HCl) permite a transmissão através da ingestão (Ferguson, 2004)

Os esporozoítos estão localizados em oocistos maduros. Os oocistos são estruturas ovoides de 12 a 13 μm que, após a esporulação, contém dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (Figura 2 C). A parede do oocisto é uma estrutura multicamada extremamente robusta que protege o parasita de danos mecânicos e químicos. Permite que os parasitas sobrevivam por longos períodos, até mais de um ano, em um ambiente úmido (Mai et al., 2009).

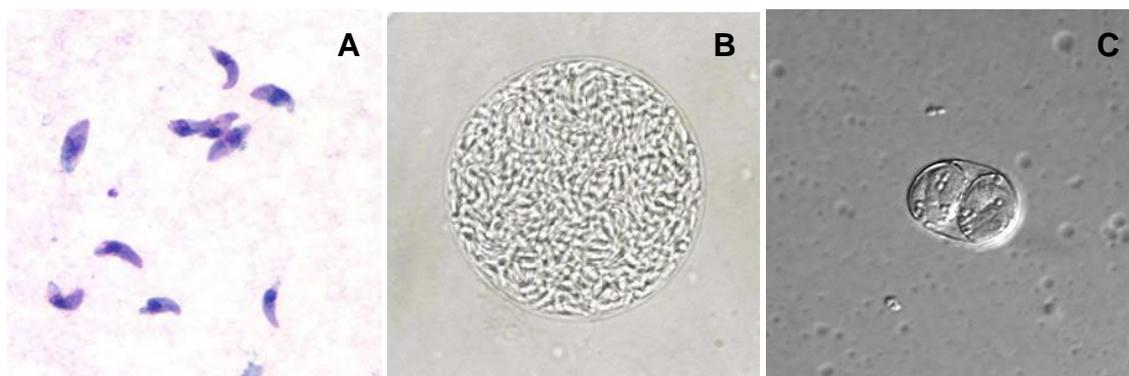


Figura 2: Formas de vida infectantes de *Toxoplasma gondii*. Tachizoítos corados com Giemsa, de um esfregaço de fluido peritoneal obtido a partir de um camundongo infectado (A), cisto cerebral não corado, obtido a partir de um camundongo infectado (B) e oocisto esporulado, visto sob microscopia de contraste. Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>.

1.3. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um coccídeo formador de cistos teciduais encontrado em predadores e presas que alterna entre hospedeiros definitivos (reprodução sexual) e intermediários (replicação assexuada). É único entre este grupo porque pode ser transmitido não apenas entre hospedeiros intermediários e definitivos (ciclo sexual), mas também entre hospedeiros intermediários via carnivorismo (ciclo assexuado) ou mesmo entre hospedeiros definitivos (Afonso et al., 2006).

A reprodução sexual ocorre apenas em felinos (gatos domésticos e selvagens). Após a ingestão de cistos presentes nos tecidos de um hospedeiro intermediário, a parede do cisto é destruída por enzimas gástricas. Os

bradizoítos se instalam nos enterócitos, onde sofrem um número auto limitante de multiplicações assexuadas, caracterizadas pelo desenvolvimento de merozoítos nos esquizontes (Figura 3) (Dubey, 1990). Este primeiro passo é seguido pelo desenvolvimento sexual, com a formação de gametas masculinos e femininos (gametogonia) (Ferguson, 2002). Após a fecundação, os oocistos formados nos enterócitos são liberados pela ruptura da célula e excretados como formas imaturas nas fezes de felinos (Figura 3). O processo de esporogonia ocorre após alguns dias no ambiente externo. Isso implica uma redução meiótica e mudanças morfológicas levando à formação de um oocisto esporulado com dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos haplóides. A liberação de oocistos começa 3 a 7 dias após a ingestão de cistos teciduais e pode continuar até 20 dias. Os gatos infectados podem liberar mais de 100 milhões de oocistos nas fezes (Jones e Dubey, 2010). Eles podem infectar uma ampla gama de hospedeiros intermediários, praticamente todos os animais de sangue quente, de mamíferos a aves, quando ingeridos com alimentos ou água. Oocistos também são infecciosos para gatos, embora menos eficiente (Jones e Dubey, 2010).

Dentro dos hospedeiros intermediários, o parasita sofre apenas desenvolvimento assexuado. Após a ingestão de oocistos, os esporozoítos são liberados. Eles penetram no epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos. Os taquizoítos se replicam rapidamente por endodiogenia dentro de qualquer tipo celular e se disseminam por todo o organismo. Como resultado da conversão de taquizoítos em bradizoítos, os cistos teciduais surgem de 7 a 10 dias após a infecção e podem permanecer ao longo da vida na maioria dos hospedeiros, predominantemente no cérebro ou musculatura (Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

Após a ingestão destes cistos teciduais por um hospedeiro intermediário através de carne crua ou pouco cozida, os cistos são rompidos à medida que passam pelo trato digestório, causando a liberação de bradizoítos. Os bradizoítos irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro e se diferenciar novamente em taquizoítos, os quais irão se dividir rapidamente e com potencial disseminação em todo o corpo (Figura 3).

Além disso, se a fase aguda ocorrer durante a gravidez, o parasita pode atravessar a placenta e infectar o feto (transmissão congênita) (Duncanson et al., 2001).

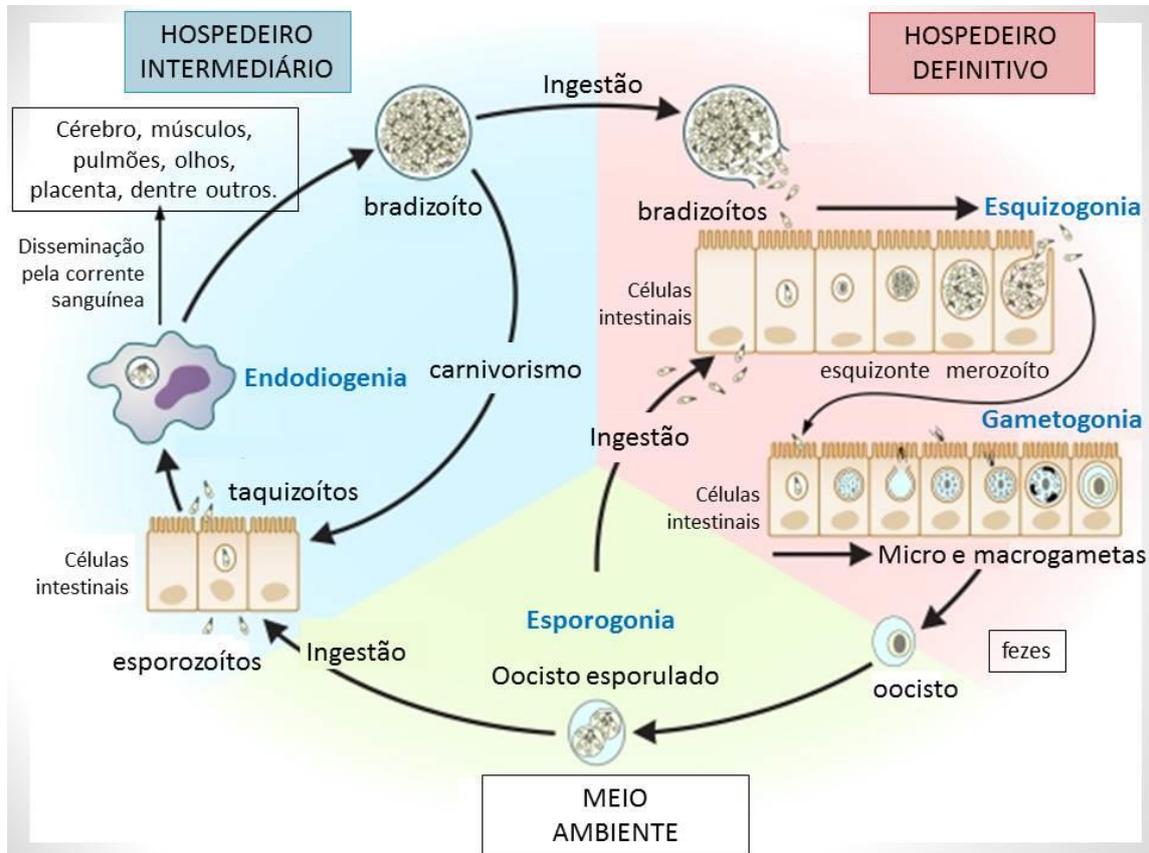


Figura 3: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. A replicação sexual ocorre apenas no intestino do gato, resultando na liberação de oocistos diploides que irão sofrer esporogonia no ambiente, para obtenção de esporozoítos. Os oocistos dão origem à infecção em uma variedade de hospedeiros intermediários. Durante a infecção aguda, ocorre a proliferação rápida de taquizoítos que se difundem no interior do hospedeiro. Cistos teciduais contendo bradizoítos dão origem a uma infecção de longo prazo e são transmitidos assexuadamente após a ingestão por via oral a uma variedade de hospedeiros. Obtido de Robert-Gangneux e Dardé (2012) e adaptado por Reimão, JQ e Zanna, RDZ.

1.4. Distribuição geográfica da toxoplasmose

Os dados de prevalência sorológica indicam que a toxoplasmose é uma das infecções humanas mais comuns em todo o mundo (CDC, 2017).

Assume-se que aproximadamente 25 a 30% da população humana mundial seja infectada por *T. gondii* (Montoya e Liesenfeld, 2004). No entanto as prevalências variam amplamente entre os países (de 10 a 80%) e muitas

vezes dentro de um determinado país ou entre diferentes comunidades da mesma região (Pappas et al., 2009). Foram observadas baixas soroprevalências (10 a 30%) na América do Norte, no Sudeste Asiático, no norte da Europa e nos países da região do Saara, na África. Foram encontradas prevalências moderadas (30 a 50%) nos países da Europa Central e do Sul, e altas prevalências foram encontradas na América Latina e nos países tropicais africanos (Pappas et al., 2009).

Muitos fatores podem afetar a soroprevalência em seres humanos. Fatores climáticos que afetam a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente e, portanto, taxas de infecção em animais produtores de carne desempenham um papel importante (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Maiores prevalências são observadas de forma clássica em países tropicais com um clima úmido e quente, e inversamente, prevalências mais baixas são encontradas em países áridos ou em países mais frios, mas fatores antropogênicos explicam grande parte das variações na soroprevalência humana, incluindo hábitos alimentares (método de cozimento da carne, lavagem das mãos, tipos de carne ou vegetais consumidos e limpeza de vegetais); hábitos econômicos, sociais ou culturais; qualidade da água; e cobertura do saneamento (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). A soroprevalência aumenta com a idade, mas a taxa de aquisição da infecção em relação à idade varia de acordo com o nível socioeconômico do país. A soroprevalência quase máxima pode ser alcançada na infância em populações que vivem em condições de higiene precária, provavelmente ligadas à contaminação hídrica por ingestão de oocistos. Isso aponta para a água como uma importante fonte de infecção humana em áreas onde os seres humanos usam água não filtrada para consumo e provavelmente também em áreas onde há contato com água doce, por exemplo, para recreação (Bahia-Oliveira et al., 2003). Por exemplo, em uma cidade localizada no norte do estado do Rio de Janeiro, a soroprevalência ajustada à idade foi de 84% para o grupo do nível socioeconômico mais baixo, em comparação com soroprevalência de 62% e 23% para os grupos de níveis socioeconômicos médio e superior, respectivamente (Bahia-Oliveira et al., 2003). A maioria das pessoas (até 84%) na população do nível socioeconômico inferior foi infectada até a idade de 15 anos, enquanto a infecção foi adquirida principalmente após a idade de 20 anos na população do nível socioeconômico superior (de cerca

de 20% da faixa etária de 20 a 29 anos e 70% do grupo etário de 40 a 49 anos) (Bahia-Oliveira et al., 2003).

A infecção por *T. gondii* é considerada amplamente prevalente em humanos e animais no Brasil. Estima-se que 50% das crianças do ensino fundamental e 50-80% das mulheres em idade fértil têm anticorpos anti-*T. gondii* (Dubey et al., 2012). Os riscos para as mulheres não infectadas de adquirir toxoplasmose durante a gravidez e ocorrer transmissão fetal são elevados porque o ambiente encontra-se altamente contaminado com oocistos. A prevalência de toxoplasmose em crianças infectadas congenitamente é também muito elevada. A partir de uma triagem sorológica realizada em material obtido de recém-nascidos, estimou-se que de 5 a 23 crianças estão infectadas a cada 10 mil nascidos vivos no Brasil. A maioria destas crianças infectadas são propensas a desenvolver sintomas ou sinais de toxoplasmose clínica (Dubey et al., 2012).

1.5. Características clínicas da toxoplasmose em humanos

1.5.1. Patogênese e desenvolvimento da resposta imune durante o curso da infecção

Após a ingestão de cistos ou oocistos, as respectivas formas encistadas, bradizoítos ou esporozoítos, invadem rapidamente o epitélio do intestino delgado, onde se convertem em taquizoítos. Os taquizoítos invadem os monócitos que estão em contato com a lâmina própria, que são células-chave para a disseminação do parasita através do fluxo sanguíneo em direção a todos os órgãos, usando-os como cavalos de Tróia para atravessar barreiras biológicas (Barragan e Hitziger, 2008), como mostrado com um modelo murino de infecção por parasitas fluorescentes intracelulares (Unno et al., 2008). Esta peculiar capacidade de invadir ativamente todas as células nucleadas, incluindo células fagocíticas profissionais, contribui para a complexidade das interações hospedeiro-parasita através da modulação direta da resposta imune do hospedeiro.

Uma resposta imune T helper 1 (Th-1) conduzida pelas células produtoras de interferon gama (IFN- γ) e interleucina-12 (IL-12) é essencial para o controle da carga parasitária (Miller et al., 2009). Após a ingestão e infecção epitelial de parasitas, há uma liberação local de quimiocinas por células infectadas, levando à atração de células da imunidade inata. Os neutrófilos são atraídos para os focos infectados por parasitas livres e contribuem para a redução da carga parasitária (Bliss et al., 2001). Outras células fagocíticas, como células dendríticas (DCs) e macrófagos, desempenham um papel fundamental no início da imunidade inata, uma vez que são as principais fontes de IL-12 e IL-18, promovendo assim o recrutamento de células assassinas naturais (NK) e promovendo a ativação de células T (Iwasak e Medzhitov, 2004), com ambos os tipos de células produzindo IFN- γ em grandes quantidades (French et al., 2006). Além disso, DCs e macrófagos podem apresentar antígenos de parasitas associados a proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, moléculas co-estimuladoras e outras células T primárias (Combe et al., 2006). Ademais, células NK e DCs também podem interagir diretamente, resultando na ativação e amplificação mútua da síntese IL-12 e IFN- γ , respectivamente. Classicamente, a liberação de IFN- γ pode desencadear a ativação de macrófagos para sintetizar o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sendo responsável por um ciclo de expansão clonal celular.

Os receptores tipo Toll (TLRs) emergiram como uma grande família de receptores envolvida no reconhecimento de moléculas não próprias. Eles têm um papel vital no desencadeamento da imunidade inata e orquestram a resposta imune adquirida durante a infecção (Gazzinelli e Denkers, 2006). Alguns dos receptores descritos no processo de resposta inicial contra *T. gondii* são TLR2 e TLR4, os quais são reconhecedores da ancora GPI do parasito e TLR11, que reconhece a profilina liberada pelo parasito (Yarovinsky, et al., 2005; Gazzinelli e Denkers, 2006). Yarovinsky e colaboradores (2005) mostraram que o TLR11 é necessário in vivo para a produção de IL-12 induzida pelo parasita, conferindo resistência à infecção. O reconhecimento adicional de antígenos parasitários por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) leva a uma exacerbação da atividade fagocítica com um aumento da produção

de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO) (Pfefferkorn, 1984).

No entanto, esta potente maquinaria tem duas limitações. A primeira limitação reside na contrapartida negativa de uma resposta imune Th-1 forte, que pode superar seu objetivo e ser responsável por uma inflamação severa, resultando em danos nos tecidos intestinais ou mesmo a morte do hospedeiro susceptível, como mostrado em camundongos C57BL/6 (Liesenfeld, 2002). Assim, existe uma necessidade de efetadores de regulação negativa, um papel dedicado pelo menos parcialmente à IL-10 e ao fator transformador de crescimento β (TGF- β), que modulam a ativação de macrófagos (Mosser, 2003).

Por outro lado, apesar dos poderosos efetores das células hospedeiras descritas acima, foi descrito que a proteína ROP16 do parasita pode processar-se rapidamente no núcleo da célula hospedeira, onde interfere com as vias de sinalização das respostas imunes do hospedeiro (Laliberté, Carruthers, 2008), levando a uma regulação negativa da produção de IL-12 por macrófagos e, posteriormente, de IFN- γ (Denkers et al., 2004). Além disso, demonstrou-se que o parasita também pode inibir os mecanismos apoptóticos da célula infectada, assegurando assim a proteção contra a destruição rápida de taquizoítos intracelulares por macrófagos e a sobrevivência a longo prazo de bradizoítos nos cistos (Laliberté e Carruthers, 2008).

No hospedeiro imunocompetente, a ruptura ocasional de cistos individuais é considerada responsável pela estimulação contínua da resposta imune, o que garante um controle dinâmico dos cistos (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

Reconhece-se há muito tempo que a infecção por *T. gondii* também induz uma imunidade humoral, através da produção de anticorpos que vão atuar em taquizoítos extracelulares liberados após o rompimento das células infectadas, limitando a multiplicação de *T. gondii* através da lise dos parasitos na presença do complemento. Os anticorpos podem também atuar pela opsonização facilitando a captura e destruição de *T. gondii* pelas células fagocíticas (Filisetti e Candolfi, 2004).

Os primeiros anticorpos produzidos na infecção por *T. gondii* são as imunoglobulinas M (IgM) aparecendo após 3 a 10 dias de infecção no soro,

independente da cepa, do hospedeiro, sexo ou idade. Um declínio progressivo então ocorre durante os próximos meses até a negatificação (Correa et al., 2007).

A imunoglobulina A (IgA) é produzida logo após IgM e regularmente surge antes de IgG podendo persistir durante seis a sete meses, variando consideravelmente no grau e tempo de permanência em adultos e crianças infectadas congenitamente (Gorgievski-Hrisoho et al., 1996). Dificilmente são encontrados na fase crônica da infecção por *T. gondii* e diferentemente de IgG, não atravessa a barreira placentária.

As imunoglobulinas G (IgG) geralmente, aparecem uma a duas semanas após a infecção, alcançando títulos máximos em seis semanas, com declínio em alguns meses ou anos, permanecendo baixos e estáveis durante toda a vida do indivíduo infectado pelo *T. gondii* (Talabani et al., 2010). Estes anticorpos são constituídos por quatro subclasses que surgem em diferentes proporções durante a infecção por *T. gondii*. No homem estão presentes as subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Foi demonstrado que IgG1 é a primeira a aparecer no soro, ao passo que IgG2, IgG3 e IgG4 são encontrados em proporções variáveis. A síntese de IgG1 e IgG3 são estimuladas por IFN- γ e aumentada por IL-10 e TGF- β . IgG2 está ligada a elevação dos níveis de IL-2 e IL-6, enquanto que IgG4 é induzido por IL-4 e IL-13 (Correa et al., 2007).

Em camundongos as subclasses encontradas são IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, no qual IgG2a e IgG2b são produzidos na fase aguda, principalmente pelo estímulo de IFN- γ enquanto que IgG1 é um marcador de fase crônica regulado por IL-4, IL-5 e IL-10 (Correa et al., 2007).

Classicamente, a detecção de anticorpos IgG, na ausência de IgM e IgA, indica toxoplasmose crônica. No entanto não permite estimar o tempo da infecção com precisão. Atualmente, a avidéz de anticorpos IgG em combinação com a análise de IgM é a melhor ferramenta para determinar quando aconteceu a infecção (Beghetto et al., 2003). Em infecções recentes, os anticorpos IgG específicos apresentam baixo poder de ligação após o contato primário com o antígeno, ou seja, baixa avidéz pelos antígenos específicos de *T. gondii*. Ao longo de semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que, nas infecções de mais longa duração, encontra-se um predomínio marcante de anticorpos de grande afinidade

(Beghetto et al., 2003). Casos de toxoplasmose aguda em humanos podem ser diagnosticados usando IgM, e IgG de baixa avidéz além de IgA que identificam infecção recente (Decoster, 1996).

Em conclusão, a determinação da resposta de anticorpos IgG de *T. gondii* e suas subclasses contribuem significativamente na compreensão da patogênese bem como no diagnóstico da toxoplasmose (Nascimento et al., 2015).

A motilidade e invasão de taquizoítos de *T. gondii* dependem da liberação de proteínas das organelas secretórias localizadas na proeminência apical do parasita, denominadas micronemas, roptrias e grânulos densos. Estas organelas secretam proteínas chave que direcionam o contato dos parasitas com as células hospedeiras, a invasão e o estabelecimento do vacúolo parasitóforo (Baum et al., 2006). Estas proteínas são denominadas antígenos excretados/secretados (ESA) e possuem papel importante na estimulação do sistema imune (Prigione et al., 2000). Os ESA representam mais de 90% dos antígenos parasitários (Daryani et al., 2003) e podem ser o primeiro alvo do sistema imune do hospedeiro. Ou seja, acredita-se que os ESA desempenham um papel crucial na indução de respostas imunes humorais e celulares adequadas contra *T. gondii* (Daryani et al., 2003).

Meira e colaboradores (2008) investigaram se a toxoplasmose cerebral induz alterações na reatividade do soro em relação aos ESA, a fim de desenvolver um ensaio para avaliação de pacientes infectados pelo HIV com toxoplasmose cerebral. Segundo os autores, a detecção de ESA por ELISA foi capaz de distinguir os soros de indivíduos sintomáticos e assintomáticos, tornando-se, portanto, um método útil no diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes infectados pelo HIV, pois forneceu evidências claras de que os anticorpos anti-ESA estão presentes principalmente em pacientes com infecção ativa (Meira et al., 2008).

1.5.2. Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes

A infecção primária adquirida é assintomática em mais de 80% dos casos de indivíduos imunocompetentes em países europeus ou na América do

Norte (Montoya e Liesenfeld, 2004). Nos casos restantes, os pacientes podem sofrer febre ou linfadenopatia cervical, às vezes associada à mialgia, astenia ou outros sinais clínicos inespecíficos. Linfadenopatia e astenia podem persistir por várias semanas, imitando a mononucleose infecciosa, especialmente porque a monocitose pode ser observada em esfregaços sanguíneos. Mais raramente, a corioretinite toxoplasmática com comprometimento visual pode revelar infecção primária (Vaessen et al., 2007).

Na verdade, a gravidade da infecção depende do genótipo do parasito. De fato, como afirmado acima, a gravidade da infecção é baixa nos países da Europa Ocidental e na América do Norte, onde as cepas de tipo II predominam (Howe e Sibley, 1995), mas muito mais altas em outras partes do mundo, como a América do Sul ou a África, onde outros genótipos circulam (Carme et al., 2002; Vallochi et al., 2005). Em particular, vários estudos mostraram maiores incidências e severidades da corioretinite no Brasil ou na Colômbia, tanto durante infecções primárias de indivíduos imunocompetentes quanto em crianças infectadas congenitamente (Gilbert et al., 2008).

1.5.3. Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos

Contrastando a configuração da infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose é uma ameaça à vida em pacientes imunocomprometidos. Vários fatores responsáveis pela imunidade celular profundamente comprometida podem levar à toxoplasmose grave, entre os quais a infecção pelo HIV e as terapias imunossupressoras (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Os pacientes estão sujeitos a um maior risco de reativação da doença resultante da ruptura do cisto do que a uma infecção recém-adquirida, mas o risco pode diferir entre as categorias de pacientes. Em pacientes transplantados, a toxoplasmose grave ou disseminada pode resultar de uma reativação da infecção latente no receptor ou infecção de um órgão contendo cisto de um doador soropositivo administrado a um receptor soronegativo (Rogers et al., 2008), uma situação em que os transplantes cardíacos apresentam o maior risco (Sanchez et al., 2011). Pode ocorrer uma reativação de uma infecção crônica no receptor, independentemente do tipo de enxerto,

mas o risco está intimamente relacionado com a duração e o grau de imunossupressão, sendo os pacientes com transplante de células-tronco hematopoiéticas em maior risco (Roemer et al., 2001). Em pacientes infectados pelo HIV, a incidência de toxoplasmose está intimamente relacionada à contagem de células T CD4⁺. A encefalite toxoplásmica é a manifestação mais predominante da doença nesses pacientes e pode levar a vários sintomas, que vão desde dor de cabeça, letargia, ataxia, hemiparesia, perda de memória, demência ou convulsões, geralmente associado à febre (Luft e Remington, 1992). A incidência da encefalite toxoplásmica diminuiu desde o emprego da terapia anti-retroviral (Jones et al., 2002). Após o cérebro, os órgãos mais frequentemente envolvidos são os pulmões, os olhos (Raubaud et al., 1996) e o coração, resultando em miocardite. O isolamento de *T. gondii* de outros locais, como fígado, pâncreas (Hofman et al., 1993), medula óssea, bexiga (Raubaud et al., 1994), linfonodos, rim, baço e pele (Arnold et al., 1997) também já foi documentado.

1.5.3.1. Reativação da infecção por *Toxoplasma gondii*

Em pacientes imunocomprometidos, a reativação da infecção por *T. gondii* é tipicamente observada após a contagem de células T CD4⁺ abaixo de 100-200 células/mm³ (Pereira-Chioccola et al., 2009). Em ocasiões raras, os cistos de bradizoítos se rompem em camundongos imunocompetentes, levando ao recrutamento rápido de células inflamatórias para o local (Ferguson et al., 1989). Na ausência de uma resposta imune normal para induzir os taquizoítos a se converterem em bradizoítos, os taquizoítos continuarão se replicar e se disseminar em todo o hospedeiro, levando a complicações graves e possivelmente à morte. Foram desenvolvidos modelos murinos para a reativação da toxoplasmose que reforçam ainda mais a relevância do IFN- γ no controle da latência (Suzuki e Joh, 1994; Dunay et al., 2009). A dexametasona imunossupressora de esteroides também foi utilizada para reativar a toxoplasmose em camundongos cronicamente infectados (Nicoll et al., 1997; Djurkovic-Djakovic e Milenkovic, 2001). Atualmente, não se sabe se a imunidade do hospedeiro impede diretamente que os bradizoítos sejam

reativados e/ou se desencadeia rapidamente funções para matar os taquizoítos que escaparam dos cistos (Sullivan e Jeffers, 2012).

A capacidade de se diferenciar em bradizoítos e formar cistos impenetráveis torna atualmente impossível erradicar *T. gondii* do hospedeiro. Embora existam medicamentos que controlem a toxoplasmose aguda, como a pirimetamina e a sulfadiazina, não existe nenhum tratamento de curta duração que possa eliminar os cistos, que também parecem imunes à resposta do hospedeiro. A presença de cistos de bradizoítos latente faz com que *T. gondii* seja uma infecção crônica e a habilidade dos bradizoítos em se converter em taquizoítos de rápido crescimento explica as altas frequências de toxoplasmose aguda observadas em indivíduos imunocomprometidos (Wong e Remington, 1993; Montoya e Liesenfeld, 2004). A encefalite toxoplasmática, caracterizada por lesões intracerebrais, é uma complicação significativa do Sistema Nervoso Central em pacientes com Aids (Sullivan e Jeffers, 2012).

1.5.4. Toxoplasmose congênita

Classicamente, a infecção congênita resulta da infecção materna primária adquirida durante a gestação. A frequência de transmissão vertical e a gravidade do dano fetal dependem do estágio da gravidez quando ocorre infecção materna. A placenta desempenha um papel principal no processo, pois é tanto uma barreira natural que visa proteger o feto e um tecido alvo para a multiplicação de parasitas (Abbasi et al., 2003). De fato, a barreira placentária é mais eficiente no início da gestação, levando à passagem de parasitas em menos de 10% dos casos durante o primeiro trimestre, mas torna-se mais permeável durante a gravidez, permitindo a transmissão do parasita em cerca de 30% dos casos o segundo trimestre e 60 a 70% dos casos no terceiro trimestre e ainda mais próximo do momento do parto (Dunn et al., 1999). A gravidade da infecção fetal é inversamente correlacionada, uma vez que os neonatos são assintomáticos em mais de 80% dos casos quando infectados durante o terceiro trimestre de gestação (Desmonts e Couvreur, 1974). No entanto, quando a transmissão transplacentária ocorre durante o primeiro trimestre, as consequências para o desenvolvimento fetal são graves, muitas

vezes levando a anormalidades graves ou ao aborto. A multiplicação de parasitas induz focos de necrose e forte inflamação, levando a graves anormalidades no cérebro e nos tecidos dos olhos. Pode induzir a destruição ou a profunda remodelação da substância branca. Os focos necrotizados infectados podem resultar em hidrocefalia de ventrículos laterais. As principais sequelas incluem retardo mental, convulsões, microcefalia, hidrocefalia, surdez e deficiência psicomotora. As lesões oculares também são mais graves no início da gravidez, onde a microftalmia, a catarata, o aumento da pressão intraocular, o estrabismo, a neurite óptica e a necrose da retina podem ser observados (Roberts et al., 2001), levando a cegueira se as lesões da retina afetarem a mácula. Durante o segundo trimestre, a infecção fetal pode ser de gravidade variável. As manifestações clínicas ao nascer podem incluir epilepsia, anemia, petéquias induzidas por trombocitopenia, erupção cutânea, distúrbios hepáticos, pneumonite ou retino-coroidite. A retino-coroidite, contudo, é uma característica comum que pode ser observada seja qual for o tempo da infecção materna (Hotez, 2008).

Embora a grande maioria das infecções congênitas resulte da infecção adquirida primariamente durante a gravidez, a transmissão do parasita pode ocorrer em raros casos em mulheres imunocompetentes e previamente imunizadas que são re-infectadas com *T. gondii* durante a gestação (Kodjikian et al., 2004). A reativação da infecção passada em mulheres infectadas pelo HIV também pode levar à transmissão congênita, conforme demonstrado por vários casos (Lindsay e Dubey, 2011).

1.6. Modelos murinos de infecção por *Toxoplasma gondii*

Algumas linhagens de camundongos são naturalmente suscetíveis à infecção por *T. gondii*, enquanto outras são resistentes ao desenvolvimento das patologias desta doença. Esta resistência/suscetibilidade pode estar relacionada ao perfil de citocinas produzido preferencialmente por cada uma destas linhagens. A linhagem C57BL/6, por exemplo, apresenta um perfil de citocinas pró-inflamatório, resultando em susceptibilidade à infecção por *T. gondii* (Liesenfeld et al., 1996). Camundongos da linhagem BALB/c, que

apresentam perfil de regulação frente à infecção por *T. gondii*, produzem citocinas inflamatórias em menor quantidade, não desenvolvendo as patologias características da infecção. Isso se deve ao fato da IL-10 regular negativamente a produção de citocinas inflamatórias, além de interferir na síntese de IFN- γ , pelo menos em parte, inibindo a síntese de IL-12 pelos macrófagos (Kasper et al., 2004). Este efeito anti-inflamatório torna possível regular a atividade imunológica durante a infecção por *T. gondii*, evitando principalmente danos ao intestino e ao cérebro (Hunter et al., 1995).

Liesenfeld e colaboradores (1996) observaram 100% de letalidade em camundongos C57BL/6 infectados pela via oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, enquanto que camundongos BALB/c sobrevivem a este mesmo inóculo. Estudos anteriores utilizaram a linhagem A/Sn para imunizações com ESA de *T. gondii*, o qual apresentou padrão de resposta imune similar à linhagem C57BL/6 (Costa-Silva et al., 2008). Neste estudo foi constatado que a cinética de parasitemia e a mortalidade nestas duas linhagens de camundongos foram similares, quando submetidas ao mesmo inóculo. Desta forma foi escolhida a linhagem A/Sn já que não havia trabalhos anteriores na toxoplasmose com esta linhagem, além da facilidade de manipulação.

Ainda que os modelos murinos existentes tenham inestimável valor para o estudo de vários aspectos da relação parasito-hospedeiro, muitos não seguem a história natural da infecção por *T. gondii*. Um modelo de toxoplasmose cerebral foi obtido pela injeção intracerebral direta de *T. gondii* em camundongos imunossuprimidos com acetato de cortisona (Hofflin et al., 1987). Nesse modelo, a toxoplasmose cerebral não é, portanto, uma consequência da recrudescência da infecção estabelecida anteriormente. Modelos de infecção obtidos pela dupla infecção de *T. gondii* e um vírus, tais como Citomegalovírus (Pomeroy et al., 1989) e LP-BM5 MuLV (Gazzinelli et al., 1992, Watanabe et al., 1993; Lacroix et al., 1994) não tiveram aplicações farmacológicas, devido à sua complexidade e potencial falta de reprodutibilidade (Lacroix et al., 1996). Em outro modelo murino, ao invés de suprimir o hospedeiro, o tratamento com sulfadiazina suprimiu a infecção, permitindo assim o desenvolvimento da cronicidade, e a sua retirada levou a recaída (Johnson, 1992).

A tentativa de reativar a infecção também foi realizada através da administração de drogas com efeito imunossupressor. Embora Frenkel et al. (1975) tenham obtido a reativação da toxoplasmose latente através do uso de cortisona em hamsters infectados com a cepa RH de *T. gondii*, em camundongos, no entanto, Sumyuen et al. (1996) observaram pouca reativação após a administração de fármacos frequentemente utilizados no transplante de órgãos como o acetato de cortisol e azatioprina. Por outro lado, Nicoll et al. (1997) obtiveram a recrudescência da infecção após o uso de dexametasona, mas não foi esclarecido por que não foi possível demonstrar histologicamente cistos cerebrais em 60-70% dos camundongos inoculados com *T. gondii*.

Uma vez que os imunossupressores são frequentemente utilizados na terapia humana, no presente trabalho, buscou-se desenvolver um modelo murino que se assemelhe ao curso natural de reativação da infecção por *T. gondii* em seres humanos, no qual camundongos imunocompetentes desenvolvam infecção crônica e sejam posteriormente imunossuprimidos com o uso de drogas imunossupressoras.

1.7. Agentes imunossupressores

Agentes imunossupressores são usados, principalmente, para evitar a rejeição de órgãos após o transplante de órgãos. O sucesso do transplante de órgãos requer a utilização de fármacos imunossupressores para evitar que o sistema imune do hospedeiro rejeite o órgão transplantado (Sing-Leung, 2001).

Nos últimos 40 anos, os medicamentos imunossupressores utilizados em transplantes clínicos evoluíram muito. Durante os anos 1960 a 1970, corticosteroides e azatioprina constituíam a base da terapia imunossupressora para o transplante de órgãos. Este período foi caracterizado por uma elevada incidência de rejeição aguda e baixa taxa de sobrevivência do enxerto. A introdução da ciclosporina A (CsA) na década de 1980 representou um importante avanço na terapia imunossupressora e melhorou substancialmente a taxa de sobrevivência de enxertos. O chamado regime de imunossupressão triplo, que consiste em corticosteroides, azatioprina e CsA, tornou-se o protocolo imunossupressor padrão para muitos centros de transplante em todo

o mundo. Os últimos 10 anos viram a adição de uma série de novos agentes no arsenal para imunossupressão, que incluem uma formulação de micro emulsão de CsA, tacrolimus, micofenolato de mofetil, rapamicina, daclizumab e basiliximab (Sing-Leung, 2001).

1.7.1. Ciclosporina A (CsA)

A CsA (Figura 4) é um undecapeptídeo cíclico originalmente obtido a partir de um extrato do fungo *Beauveria nivea*. É um imunossupressor poderoso com uma ação específica em linfócitos T. É utilizada para a profilaxia da rejeição de enxertos em transplante de órgãos e tecidos (Hardman et al., 1996).

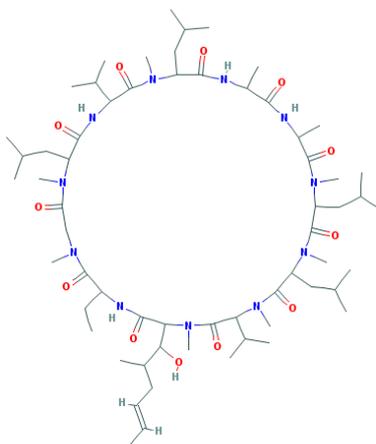


Figura 4: Fórmula estrutural da Ciclosporina A. Fonte: PubChem Compound (2015a).

A CsA liga-se à ciclofilina, uma proteína intracelular ubíqua, para criar o complexo de fármaco ativo. O complexo ciclofilina-CsA inativa a calcineurina, uma enzima crucial na via de sinalização do receptor de células T. A inibição da calcineurina suprime a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-2 e INF- γ) (Sing-Leung, 2001).

A história da CsA começou a partir de amostras de solo em Wisconsin (EUA), que foram propagadas e estudadas nos laboratórios da Companhia Sandoz na Suíça. Isto resultou no cultivo do fungo que foi utilizado para sintetizar a CsA. O fungo ainda hoje é utilizado para a produção da CsA em escala comercial por meio de fermentação. Desde então este metabólito

fúngico hidrofóbico é usado como primeira escolha para a neutralização dos fenômenos de rejeição em pacientes que realizaram transplante de órgãos e para o tratamento de várias doenças auto-imunes (Ponnaiyan e Jegadeesan, 2015).

1.7.2. Dexametasona (Dex)

A Dex (Figura 5) é um corticosteroide sintético que exibe tanto propriedade anti-inflamatória como imunossupressora. Este fármaco é utilizado com frequência no período perioperatório, para profilaxia contra náuseas e vômitos e edema cerebral, e pode ser útil no tratamento de perturbações neurológicas agudas e dores crônicas (PubChem Compound, 2015b).

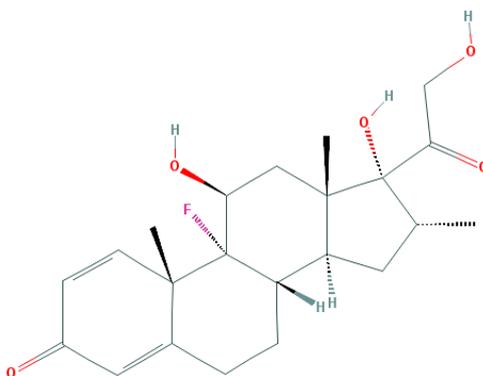


Figura 5: Estrutura química da Dexametasona. Fonte: PubChem Compound (2015b).

Como todos os glucocorticóides, a Dex atua sobre o receptor de glucocorticóides. Várias vias de sinalização estão envolvidas após a ligação do esteroide ao receptor, incluindo a ligação direta do DNA, que resulta em mudanças na transcrição gênica. Isso resulta em mudanças na síntese de carboidratos, proteínas e no metabolismo de gorduras, bem como em alterações na gliconeogênese. Esse fármaco induz a redução na liberação de bradiquinina, fator de necrose tumoral, IL-1, IL-2 e IL-6 prostaglandinas.

1.8. Justificativa

Os padrões de resposta imune em pacientes infectados com *T. gondii* e imunossuprimidos não estão totalmente esclarecidos. Estudos que abordam a resposta imune no modelo animal podem contribuir para um melhor entendimento da doença em humanos.

O Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, coordenado pela Prof^a Dr^a Vera Lucia Pereira-Chioccola, realiza diagnósticos moleculares de diferentes infecções parasitárias e desenvolve pesquisas com o objetivo de aprimorar técnicas e obter melhor entendimento da relação parasita-hospedeiro. Dessa forma, o presente estudo é o desenvolvimento da continuidade de pesquisas anteriores sobre diagnóstico e resposta imunológica de pacientes humanos co-infectados com *T. gondii* e HIV (Meira et al., 2008; Meira et al., 2013) e dos padrões de resposta imunológica em modelo experimental imunizado com antígenos de *T. gondii* (Costa-Silva et al., 2008; Costa-Silva et al., 2012). Dessa forma, a padronização e avaliação de padrões de resposta imunológica em modelo experimental imunossuprimido servirá para complementação de dados obtidos anteriormente e, futuramente, servirá de base para novos estudos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar padrões de resposta imune celular e humoral desencadeada pela toxoplasmose sintomática no modelo experimental.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer um modelo murino com a associação imunossupressão/toxoplasmose.
- Comparar a imunossupressão através da contagem de leucócitos em camundongos A/Sn não infectados e infectados cronicamente com *Toxoplasma gondii* após a administração de agentes imunossupressores.
- Analisar a participação de ATL e ESA na estimulação da resposta imune protetora avaliando os níveis das citocinas IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ obtidas de esplenócitos, bem como os níveis de anticorpos IgM, IgG, IgG1 e IgG2a em soros obtidos a partir de camundongos A/Sn infectados com *T. gondii* e imunossuprimidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O desenvolvimento do estudo cumpriu com os aspectos éticos envolvidos em experimentos que envolvam o uso de animais, seguindo as recomendações do “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA) após ser avaliado e aprovado na Comissão de Ética do Instituto Adolfo Lutz / Instituto Pasteur sob número CEUA-IAL/Pasteur nº 10/2013. (Anexo 1).

3.2. Animais experimentais

Para a manutenção de populações de *T. gondii* das cepas RH e ME 49; e em experimentos de tratamentos imunossupressores, foram utilizados camundongos A/Sn, fêmeas, com idade entre 25 a 30 dias, conforme descrito previamente (Costa-Silva et al., 2008), provenientes do Biotério de Experimentação do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

3.3. Cepas de *Toxoplasma gondii*

Foram utilizadas duas cepas de *T. gondii* de referência: RH, do tipo I, altamente virulenta, não cistogênica e de multiplicação rápida (Sabin e Feldman, 1948; Dubey, 1993; Howe e Sibley, 1995) e cepa ME 49, do tipo II, produtora de cistos teciduais (Howe e Sibley, 1995). As duas cepas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e mantidas no biotério experimentação do Instituto Adolfo Lutz.

3.3.1. Manutenção de cepas RH para produção de antígenos

Toxoplasma gondii da cepa RH foram utilizados para a manutenção dessa população em laboratório, através de passagem para novo lote de animais; e para infecção das culturas de células VERO (descrito na seção 3.4) e posterior preparação de antígenos (descritos nas seções 3.5 e 3.6).

Os parasitas da cepa RH foram mantidos em camundongos após inoculação por via intraperitoneal com 1×10^5 taquizoítos/animal. Após quatro dias de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e foram feitas lavagens intraperitoneais com 5 mL/animal de NaCl 0,85% estéril para a retirada dos taquizoítos. Posteriormente, foi feita a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e acertada para a concentração de inoculação (1×10^5 taquizoítos/animal) (Figura 6).

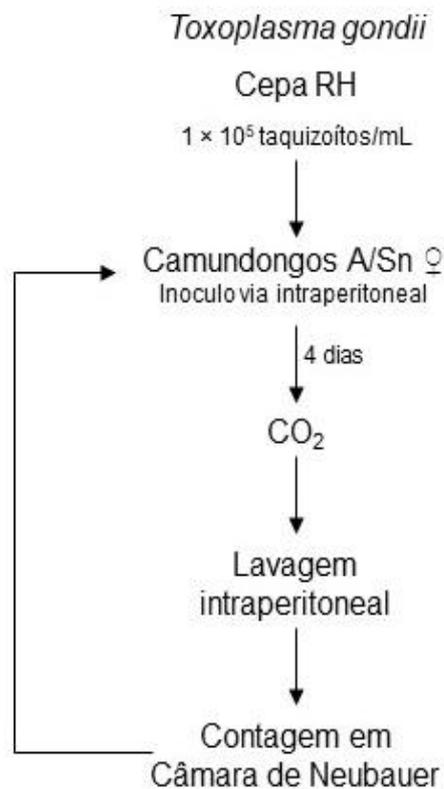


Figura 6: Representação esquemática dos procedimentos realizados para manutenção de *Toxoplasma gondii* cepa RH.

3.3.2. Manutenção de cepas ME 49 para infecção

Para a manutenção da cepa ME 49, grupos de camundongos foram mantidos com a infecção. Para a utilização nos grupos experimentais ou renovação de grupos de manutenção de cepa, cérebros de camundongos crônicos foram extraídos, após eutanásia, e macerados em 5 mL de solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7.2. As contagens dos cistos foram realizadas em microscópio de luz (Olympus BX40) com utilização de objetivas de 40x e 100x. Após realização das contagens, 10 cistos foram inoculados em cada camundongo pertencente à grupos de animais experimentais denominados “Infectados (I)” (Figura 7).

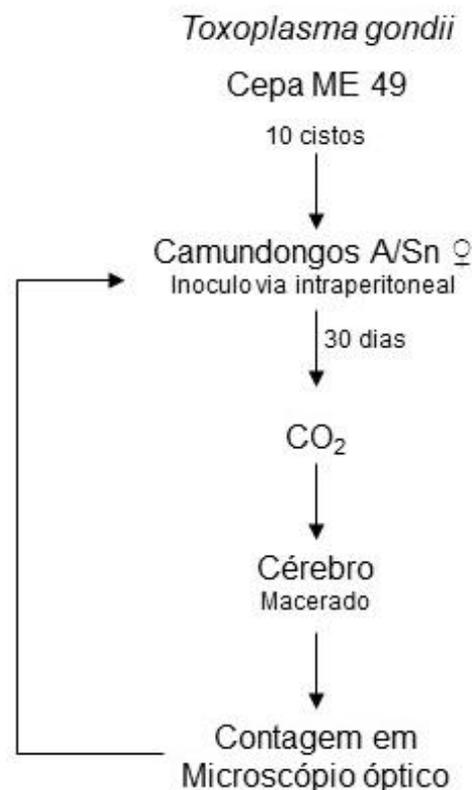


Figura 7: Representação esquemática dos procedimentos realizados para manutenção de *Toxoplasma gondii* cepa ME 49.

3.4. Padronizações e escolha do tratamento com imunossupressores

3.4.1. Grupos experimentais tratados com Ciclosporina A (CsA)

CsA é um imunossupressor com ação específica em linfócitos T. É utilizada para a profilaxia da rejeição de enxertos em transplante de órgãos e tecidos (Hardman et al., 1996).

Para padronização da contagem de leucócitos no tratamento imunossupressor por CsA, foram aplicadas injeções 3 vezes por semana, via subcutânea, com dose igual a 50 mg/kg em camundongos fêmeas da linhagem A/Sn, durante 15 dias. Os camundongos foram divididos em dois grupos: Não infectado (NI) e Infectado com *T. gondii* /Tratado (I/T_{CsA50/3x}) (Figura 8 e Tabela 1).

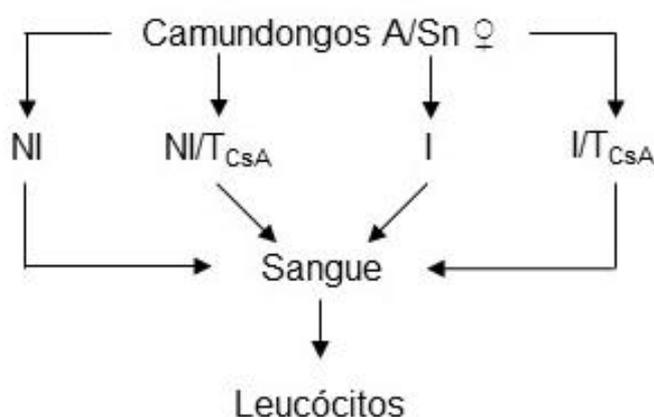


Figura 8: Representação esquemática dos procedimentos realizados com o imunossupressor Ciclosporina (CsA). NI: Não Infectado; NI/T_{CsA}: Não Infectado/Tratado com CsA; I: Infectado com *Toxoplasma gondii*; I/T_{CsA}: Infectado com *Toxoplasma gondii*/Tratado com CsA.

Tabela 1: Descrição dos grupos de camundongos A/Sn utilizados na padronização da contagem de leucócitos em tratamento imunossupressor por CsA.

Grupo	Número de camundongos	Tratamento CsA
NI	10♀	Sem tratamento
I/T _{CsA} 50/3x	10♀	50 mg/kg, 3x por semana

Posteriormente foram estabelecidos esquemas de tratamento diferenciados para análise de imunossupressão (Tabela 2). Cada grupo experimental foi composto por dois camundongos fêmeas da linhagem A/Sn e receberam CsA via subcutânea.

Tabela 2: Descrição dos grupos de camundongos A/Sn utilizados nos experimentos com CsA

Grupo	Número de camundongos	Tratamento CsA
NI/T _{CsA} 10/3x	2♀	10 mg/kg, 3x por semana
NI/T _{CsA20} /3x	2♀	20 mg/kg, 3x por semana
NI/T _{CsA} 50/3x	2♀	50 mg/kg, 3x por semana
NI/T _{CsA} 20/dia	2♀	20 mg/kg, diariamente
I/T _{CsA} 20/dia	2♀	20 mg/kg, diariamente

3.4.2. Grupos experimentais tratados com Dexametasona (Dex)

Dex é um glucocorticóide utilizado frequentemente para causar imunossupressão em modelos experimentais (Jeklova et al. 2008). Foi ministrada em dose de 10 mg/L diluída em água destilada, acondicionada em bebedouros distribuídos em gaiolas de grupos de camundongos similar à metodologia utilizada por Nicoll et al. (1997). Os recipientes eram agitados diariamente no intuito de evitar possíveis sedimentações. A cada 72 horas o conteúdo total era substituído, evitando prováveis proliferações de contaminantes, como fungos e bactérias.

Inicialmente 42 camundongos da linhagem A/Sn foram infectados por via intraperitoneal com 10 cistos da cepa ME 49 e, após 30 dias, para estabelecimento de infecção crônica, o tratamento com Dex foi iniciado. Os camundongos foram separados em grupos de acordo com o período de tratamento, conforme apresentado na Tabela 3. De acordo com o prazo de tratamento estabelecido, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e dissecados para obtenção de 1 mL de sangue, via corte na aorta (para contagem de leucócitos, PCR e ELISA) e baço (para ensaio de proliferação de esplenócitos) (Figura 9).

Tabela 3: Descrição dos grupos de camundongos A/Sn utilizados nos experimentos com Dexametasona.

Grupo	Número de camundongos	Tratamento Dex
I	3	Sem tratamento
I/T _{Dex7}	2	7 dias
I/T _{Dex14}	2	14 dias
I/T _{Dex21}	3	21 dias
I/T _{Dex28}	4	28 dias
I/T _{Dex35}	4	35 dias
I/T _{Dex42}	8	42 dias
I/T _{Dex49}	8	49 dias
I/T _{Dex56}	8	56 dias

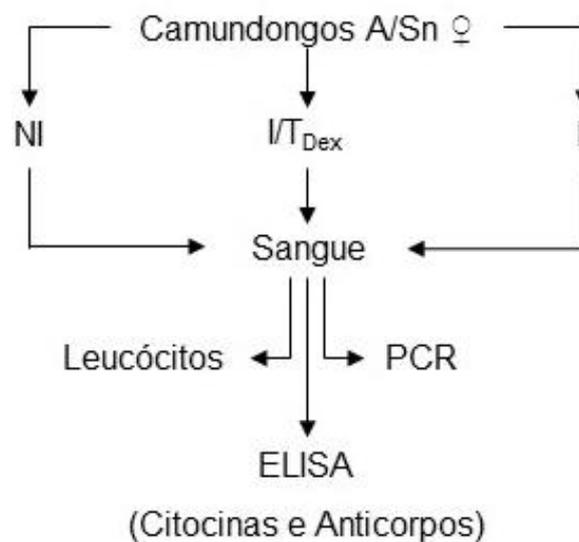


Figura 9: Esquema dos procedimentos realizados com o imunossupressor Dex.: NI: Não infectado; I: Infectado com *Toxoplasma gondii* e I/T_{Dex}: Infectado com *Toxoplasma gondii*/Tratado com Dex.

3.5. Padronização dos métodos diagnósticos

3.5.1. Contagem de leucócitos

Foram utilizados 20 camundongos divididos em dois grupos. O grupo Não Infectado (NI) foi composto por 10 camundongos sem infecção por *T. gondii* e o grupo Infectado (I), por 10 camundongos infectados por *T. gondii* por 30 dias (infecção intraperitoneal com 10 cistos da cepa ME 49).

Amostras de sangue periférico (30 μ L) foram obtidas após cortes nas extremidades das caudas. Uma gota da amostra do sangue periférico foi colocada em câmara de Neubauer e as contagens de leucócitos foram realizadas em microscópio óptico (Olympus BX40) após coloração pelo líquido de Turk (Figura 10).

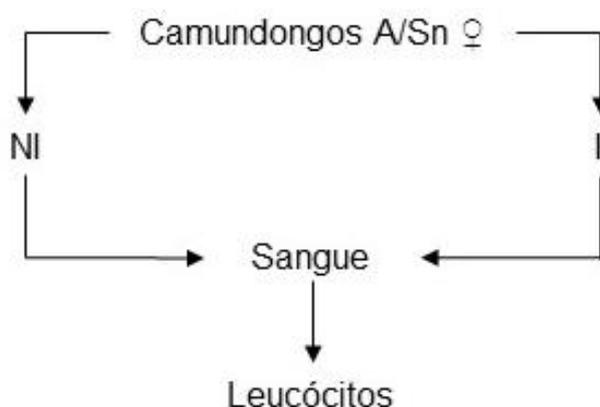


Figura 10: Representação esquemática da contagem de leucócitos em camundongos A/Sn fêmeas dos grupos Não Infectado (NI) e Infectado (I) com *Toxoplasma gondii*.

3.5.2. Extração de DNA e PCR

Alíquotas do sangue dos camundongos e uma suspensão de 1×10^7 taquizoítos/mL (controle positivo) foram utilizadas para extração de DNA pelo kit comercial (QIAGEN DNA blood and tissue) seguindo as recomendações do fabricante. Concentrações de DNA e pureza foram determinadas pela razão de D.O a 260 e 280 nm em um espectrofotômetro NanoDrop ND100 (Thermo

Scientific) As reações foram realizadas com um “Kit” (GoTaq® Green Master Mix - Promega) contendo 2x GoTaq® Green, em tampão (pH 8.5), 400µM dATP, 400 µM dGTP, 400µM CTP, 400µM dTTP, e 3mM MgCl₂. Em cada teste foram adicionados 5 µL de DNA dos animais (e 1 µL do controle positivo), 50 pmols de cada iniciador, 12,5 µL do GoTaq® Green em um volume final de água Milli-Q autoclavada. Os iniciadores moleculares utilizados foram: B22 (5'AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA3') e B23 (5'TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC3'), que amplificam uma sequência de 115 pares de bases (pb) de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii* (Burg et al., 1988; 1989).

O gene B1 se repete 35 vezes no genoma do *T. gondii* e está presente e conservado em todas as cepas de *T. gondii* testadas até o momento. A detecção do gene B1 por PCR confere sensibilidade e especificidade, sendo, portanto, muito útil para o diagnóstico da toxoplasmose (Burg et al., 1989).

As amplificações foram realizadas em um termociclador (LongGene) e consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95° C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto. Após essa etapa o processo foi finalizado por um ciclo final de extensão por 5 minutos a 72° C (Colombo et. al., 2005). Para cada reação foi incluído controle negativo. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV. As imagens foram analisadas por uma câmara de gel MiniBIS sistema de documentação e (BioSystematica). Os tamanhos dos fragmentos foram determinados com base na comparação de um marcador molecular de 100 pb.

3.6. Infecção de células VERO com *Toxoplasma gondii*

Culturas de células VERO (ATCC CCL – 81), gentilmente cedidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz/SP foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em garrafas de 75 cm³ (Corning) com 10 mL de meio Eagle's (Gibco) contendo 292 mg/L de L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sódio, 1,0 g/L de glicose, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 100.000 U/L de

penicilina, 133 mg/L de estreptomicina suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab). Após a formação da monocamada de células por volta de 48 horas de incubação, as garrafas foram lavadas três vezes com meio sem adição de SFB para a eliminação de resquícios, principalmente das proteínas, do mesmo. A seguir foram adicionados 10 mL do mesmo meio e as células infectadas com 1×10^7 taquizoítos (cepa RH) provenientes de camundongos ou de outra garrafa infectada. Após 48 horas de incubação, coletou-se o sobrenadante contendo taquizoítos e realizou-se a contagem dos parasitas em Câmara de Neubauer. Quando necessário, a concentração de parasitas foi acertada em 1×10^7 taquizoítos (cepa RH) para a infecção de uma nova garrafa e o sobrenadante utilizado para a produção de antígenos.

3.7. Produção de antígeno ESA

As ESAs foram preparadas como descrito por Meira et al. (2011). Os sobrenadantes das culturas celulares infectadas por *T. gondii* foram colhidos após 48 horas de infecção, passados para tubos de 15 mL (Corning). A seguir, os parasitas foram removidos por duas centrifugações de 2800 g por 10 minutos e filtrados em membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, USA). O sobrenadante livre de taquizoítos, contendo as ESA foi suplementado com adição de 10 µg/mL de um coquetel de inibidores de protease, contendo por mL: AEBSF 20 µM; EDTA 10 µM; Bestatin 1,3 µM; E-64 0,14 µM; Leupeptin 10 nM e Aprotinin 3 nM (Sigma) e concentrado em *Speed Vac* (RC 10.09 - Jouan) por 4 horas. O concentrado final foi colocado em saco de diálise com poros que retém moléculas com massa molecular superiores a 12 kDa (Sigma) e dialisado contra PBS pH 7,2 a 4°C por aproximadamente 18 horas (Figura 11).

3.8. Produção de antígeno ATL

As preparações foram realizadas conforme descrito anteriormente (Meira et al., 2011). Suspensões de 2×10^7 taquizoítos/mL provenientes de culturas de

células VERO foram centrifugadas por 15 minutos a 1800 g. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e os parasitas foram lavados três vezes com 40 mL PBS 0,01 M pH 7.2 por 15 minutos a 1800 g. Os taquizoítos foram rompidos por ultra-som (Sonic Dismembrator Quigley, USA) por 10 ciclos (1,0 A/min) por 5 minutos com intervalos de 2 minutos. Após a certificação da lise dos parasitas por visualização em microscópio óptico (Olympus BX40), o ATL foi dissolvido em 0,3 M NaCl e as concentrações proteicas foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop 100 (Thermo Scientific). O antígeno foi aliquotado e estocado à -70°C (Figura 11).

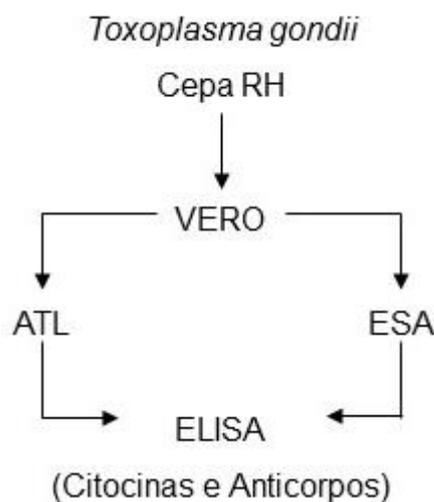


Figura 11: Representação esquemática dos procedimentos realizados para obtenção dos antígenos avaliados. ATL (Antígenos de Taquizoítos Lisados); ESA (*Excreted/Secreted Antigens*).

3.9. Obtenção de linfócitos e ensaios de linfoproliferação

Baços de 2 a 3 camundongos A/Sn dos grupos Infectado (I) e Infectado/Tratado (I/T_{Dex}) foram retirados em condições estéreis e com o auxílio de tesoura e pinça. Posteriormente o baço foi dissociado em PBS (PH 7.2) em uma placa de Petri e com ajuda de duas lâminas com extremidade esmerilhada o baço foi comprimido entre as duas extremidades. O conteúdo da placa de Petri, com as células em PBS, foi transferido para um novo tubo, adicionado PBS até completar 20 mL e centrifugado em 1000 g por 10 min a 4° C. Sobre o sedimento foi adicionado tampão ACK pH 7,2 (NH₄Cl 0,15M; KHCO₃ 10mM;

Na₂EDTA 0,1M) e deixado agir por 5 minutos em repouso. Posteriormente as células do baço foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI, 10% SFB, β-Mercaptoetanol e antibióticos (penicilina: 50 U/mL ou estreptomicina: 50 mg/mL) e incluídas em placa de 48 poços (500 µL/poço – 5×10⁶/poço mL). Alíquotas contendo 20 µL da solução celular foram adicionados 20 µL de corante Azul de Tripán; dessa solução obteve-se, através da utilização de câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico (Olympus BX40), a contagem de células viáveis.

Os linfócitos obtidos (2×10⁶ células/poço) foram distribuídos em placas de 48 poços, incubados com ESA e ATL (5µg para TNF-α, IFN-γ e IL-5 e 25µg para IL-10). Para controle dos experimentos *in vitro*, em todos os ensaios realizados com esplenócitos, foram incluídos dois poços controles em duplicata (positivo e negativo). Os poços que ficaram sem estímulo, apenas com o meio de cultura foram considerados como controle negativo. Os outros dois poços foram estimulados com o proliferador mitótico Concanavalina A. (ConA, Sigma 2 µg/mL, sendo considerados controles positivos. Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos foram coletados após 24 horas para dosar TNF-α, 48 horas para IL-10, e 72 horas para IL-5 e IFN-γ. Foram feitos pelo menos três experimentos *in vitro* para cada grupo de animal.

3.10. Dosagem de citocinas

Após os experimentos *in vitro* descritos acima as citocinas IFN-γ, IL-5, TNF-α e IL-10 foram dosadas nos sobrenadantes colhidos com o auxílio de kits específicos (Ebioscience) por ELISA, sendo seguidas as instruções do fabricante. A absorbância foi mensurada em um leitor de ELISA (Multiscan; Labsystems) com o filtro 450 nm. Os resultados expressos em D.O. (densidade óptica) foram convertidos em pg/mL a partir de uma curva de concentração feita com um anticorpo recombinante sabidamente conhecido que integrava o kit. Os limites máximos de detecção para cada teste foram: IFN-γ = 125 pg/mL, IL-5 = 250 pg/mL, IL-10 = 2000 pg/mL e TNF-α = 125 pg/mL. Os limites mínimos de detecção para cada teste foram: IFN-γ = 7,81 pg/mL, IL-5 = 0,244 pg/mL, IL-10 = 62,5 pg/mL e TNF-α = 1,95 pg/mL.

3.11. Dosagem de IgM, IgG, IgG1 e IgG2a

As dosagens de imunoglobulinas foram realizadas por ELISA dos soros de camundongos. Os antígenos foram diluídos em tampão bicarbonato de sódio 0.1M pH 8.5. Para a sensibilização foram adicionados 50 µL/poço do antígeno diluído. As concentrações estabelecidas para os antígenos foram ESA: IgM, IgG, IgG1 e IgG2a = 40 µg/mL; e ATL: IgM, IgG, IgG1 e IgG2a = 1 µg/mL. As placas foram incubadas por 24hs a 4°C e o excesso de antígeno foi retirado por duas lavagens com PBS-Tween. A seguir as placas foram bloqueadas com 100 µL de PBS Leite 5%, por uma hora a 37°C e procederam-se duas lavagens com PBS Tween.

Os soros foram então, diluídos em PBS leite 5% (1:50) e então, 50 µL de cada amostra (em duplicata) foram adicionados em placas previamente sensibilizadas (ATL ou ESA) e incubadas por uma hora a 37°C. Após novas cinco lavagens com PBS Tween 0,05% foram adicionados 50 µL/orifício de IgM, IgG, IgG1 ou IgG2a de camundongo conjugadas a peroxidase (Sigma) e diluídas em 1:4000. As placas foram então, incubadas por mais uma hora a 37°C. Após novas lavagens, as revelações ocorreram com a adição de 100 µL do substrato enzimático contendo 0,5 mg/mL de OPD (orto-fenilenodiamina) diluído em fosfato de sódio dibásico 0,1 M pH 4.5; ácido cítrico 0,1 M; H₂O₂ 0,1% por 30 minutos em câmara escura, a 37°C. A reação foi interrompida adicionando 50 µL de H₂SO₄ 4 N.

Os resultados gerados, independente do antígeno utilizado foram analisados em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan) em comprimento de onda de 492 nm. Foram calculadas as médias dos valores em densidade óptica (D.O.) dos soros testados em duplicatas. Em cada ensaio, um soro negativo e um soro de animal cronicamente infectado foram incluídos como controle negativo e como controle positivo, respectivamente.

3.12. Análise de dados

As análises dos resultados foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 e Microsoft Excel. Os dados com mais de dois grupos foram analisados quanto a significância estatística pelo teste *One way ANOVA* seguido pelo teste *Tukey*. Os dados com 2 grupos foram analisados quanto a significância estatística pelo teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Todas as análises correspondem pelo menos a três experimentos e representam os valores médios com desvio padrão (DP).

4. RESULTADOS

4.1. Padronizações dos métodos diagnósticos

4.1.1. Diagnóstico molecular dos camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*

Amostras de DNA extraídas de sangue de cinco camundongos, coletadas semanalmente pelo período de quatro semanas, foram analisadas por cPCR. As análises foram feitas para avaliar a evolução da infecção em camundongos infectados com dez cistos da cepa ME 49 por via intraperitoneal. Os resultados obtidos mostraram que quatro amostras foram positivas na PCR, indicando a presença de parasitemia. O controle negativo (sangue de um animal sem infecção) sempre apresentou resultado negativo. Esta etapa foi realizada com o objetivo de avaliar a presença de infecção nos camundongos por meio do diagnóstico molecular.

4.1.2. Contagem de leucócitos

A média das contagens de leucócitos dos camundongos do grupo NI (n = 10) e do grupo I (n = 10) foi de $6,9 \times 10^6$ leucócitos/mL e $5,7 \times 10^6$ leucócitos/mL, respectivamente (Figura 12).

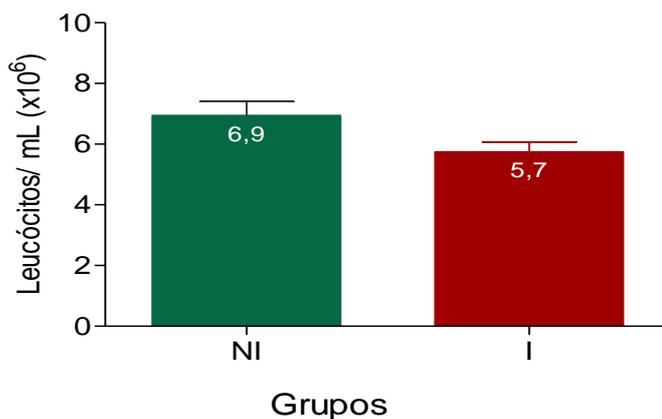


Figura 12: Contagem de leucócitos de amostras de sangue dos camundongos dos grupos NI (não infectado) e I (infectado com *Toxoplasma gondii*) (n=10/grupo). As contagens do número de leucócitos/mL de sangue periférico foram feitas em câmara de Neubauer. Não foi observada diferença estatística entre ambos grupos.

4.2. Padronizações para a escolha do tratamento com os fármacos imunossupressores

4.2.1. Tratamento com Ciclosporina (CsA)

4.2.1.1. Contagem de leucócitos nos grupos de camundongos NI e I/T_{CsA50/3x}

Foram realizadas seis coletas de sangue dos camundongos do grupo NI (não infectado) e do grupo I/T_{CsA50/3x} (infectado a mais de 30 dias, tratado com 50 mg/kg de CsA por 15 dias) e os leucócitos foram contados em duplicata. Os resultados obtidos foram $9,3 \times 10^6$ e $6,5 \times 10^6$ leucócitos/mL de sangue nos grupos NI e I/T_{CsA50/3x}, respectivamente (Figura 13).

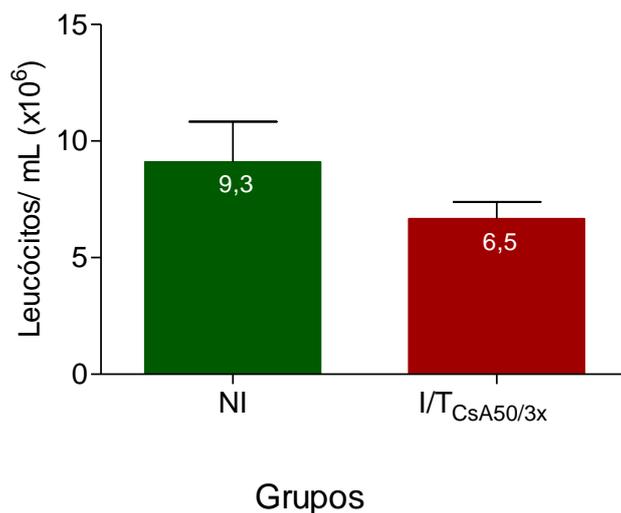


Figura 13: Contagem de leucócitos de amostras de sangue de camundongos do grupo NI (não infectado) e camundongos do grupo I/T_{CsA50/3x} (infectados e tratados com CsA). As contagens de sangue periférico foram feitas em câmara de Neubauer. Não foi observada diferença estatística entre ambos.

4.2.1.2. Determinação da dose de Ciclosporina A (CsA)

Foram realizados testes de tratamento com CsA em camundongos fêmeas da linhagem A/Sn na tentativa de se estabelecer o esquema ideal de tratamento com o agente imunossupressor. A Figura 14 mostra a média da contagem de leucócitos dos grupos NI com os diferentes esquemas de tratamento e um grupo I (infectados). Os resultados das concentrações de leucócitos para os grupos NI/T_{CsA10/3x}, NI/T_{CsA20/3x}, NI/T_{CsA50/3x}, NI/T_{CsA20/dia} e I/T_{CsA20/dia} foram de $8,1 \times 10^6$, $4,8 \times 10^6$, $4,5 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$ e $4,5 \times 10^6$ leucócitos/mL, respectivamente.

As porcentagens de imunossupressão mostradas na Figura 13 foram calculadas com relação ao grupo NI (Figura 15), que foi de $9,3 \times 10^6$ leucócitos/mL. Os resultados para os grupos NI/T_{CsA10/3x}, NI/T_{CsA20/3x}, NI/T_{CsA50/3x}, NI/T_{CsA20/dia} e I/T_{CsA20/dia} foram respectivamente 13%, 47,75%, 51,3%, 45,5% e 30,3%.

As amostras de DNA extraídas de sangue destes animais também foram analisadas por cPCR. Como mostra a Tabela 4, os resultados de PCR foram inconclusivos. Embora os animais estavam tratados com o imunossupressor, as cPCRs não foram positivas em todas as amostras. Concluiu-se, então, que

20 mg/mL foi tão efetiva quanto as doses superiores ou em dias consecutivos, mas não foi suficiente para imunossuprimir em mais que 51,3% dos animais experimentais. Então, outro imunossupressor foi testado.

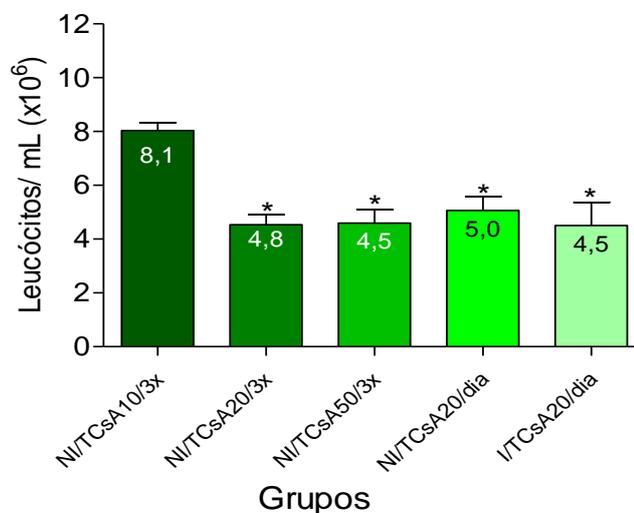


Figura 14: Contagem de leucócitos de amostras de sangue de camundongos tratados com CsA. A contagem de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Os dados apresentados foram obtidos calculando-se a média (\pm DP) de cada grupo de animais. * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NI/T_{CsA10/3x} ($p < 0,005$).

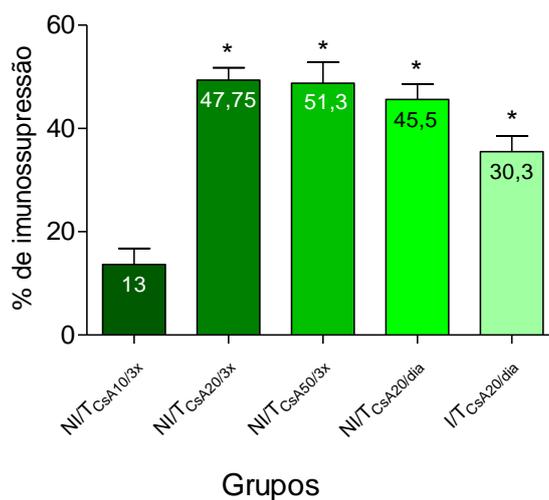


Figura 15: Porcentagens de imunossupressão por CsA em camundongos A/Sn. As porcentagens foram calculadas com base no valor do número de leucócitos/mL do grupo NI ($9,3 \times 10^6$ leucócitos/mL), e apresentou diferença estatisticamente significativa ($*p < 0,005$).

Tabela 4: Resultados de cPCR de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*.

Camundongos*	Dias pós-tratamento**	PCR
I	NA***	+
NI	NA***	-
I/T _{CsA20/3x}	7	+
	14	-
	21	-
	28	-
I/T _{CsA50/3x}	7	+
	14	-
	21	-
	28	-
I/T _{CsA20/dia}	7	-
	14	-
	21	-
	28	-
I/T _{CsA20/dia}	7	+
	14	+
	21	-
	28	-

* Infectados por via intraperitoneal com 10 cistos da cepa ME 49.

** Tratamento iniciado após período de 30 dias de infecção.

*** Não avaliado.

4.2.2. Tratamento com Dexametasona (Dex)

4.2.2.1. Contagem de leucócitos

O tratamento imunossupressor com Dex foi testado em 42 camundongos. Para as contagens de leucócitos, alíquotas de sangue foram coletadas e coradas com líquido de Turk. Os resultados obtidos indicaram uma

redução significativamente significativa no número de células a partir da 1ª semana de tratamento com Dex. Os dados apresentados foram obtidos calculando-se a média entre os animais representativos de cada período avaliado.

Os valores médios obtidos foram: I = $9,1 \times 10^6$ céls/mL; I/T_{Dex7} = $7,95 \times 10^6$ céls/mL; I/T_{Dex14} = $1,47 \times 10^6$ céls/mL; I/T_{Dex21} = $0,6 \times 10^6$ céls/mL; I/T_{Dex28} = $0,41 \times 10^6$ céls/mL; I/T_{Dex35} = $0,34 \times 10^6$ céls/mL; I/T_{Dex42} = $0,22 \times 10^6$ céls/mL; I/T_{Dex49} = $0,11 \times 10^6$ céls/mL e I/T_{Dex56} = $0,06 \times 10^6$ céls/mL (Figura 16).

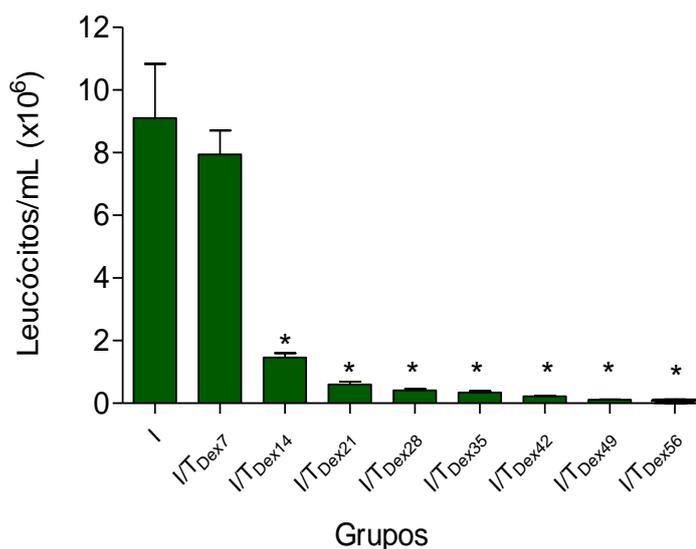


Figura 16: Contagem de leucócitos de amostras de sangue de camundongos infectados por *Toxoplasma gondii* 30 dias pós-infecção e tratados com Dex (10mg/L). A contagem de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Os dados apresentados foram obtidos calculando-se a média \pm DP por grupo. * diferença estatisticamente significativa a $p < 0,0001$.

4.2.2.2. Porcentagem de Sobrevivência

Dos 42 animais utilizados, 7 (16,66%) morreram, enquanto 35 (83,34%) sobreviveram. A ocorrência de mortes foi constatada nos seguintes períodos de tratamento: 3ª semana/21º dia (1); 4ª semana/28º dia (2); 5ª semana/35º dia (1); 6ª semana/42º dia (2); e 7ª semana/49º dia (1) (Figura 17).

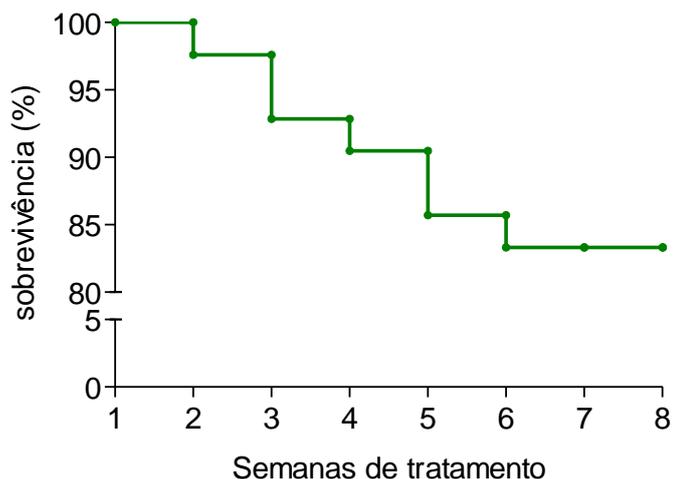


Figura 17: Porcentagem de sobrevivência de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10mg/L). A porcentagem de sobrevivência após 8 semanas de tratamento foi de 83,33%.

A partir destes resultados, os experimentos relativos à resposta imune celular e humoral em camundongos imunossuprimidos foram realizados com animais imunossuprimidos por Dex.

4.3. Dosagem dos níveis de citocinas

4.3.1. Determinação de limites de detecção das citocinas

As dosagens das citocinas dos animais experimentais foram realizadas calculando-se as concentrações através de curvas-padrão para cada citocina (IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ) por ELISA. Todo ensaio foi feito com uma curva-padrão em paralelo. As curvas-padrão foram geradas a partir dos valores de absorbância (D.O.) e a concentração de cada citocina. Como mostra a Figura 18, foi possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração. As regressões lineares apresentaram valores confiáveis de r^2 . Também foi possível determinar o limite de detecção de cada ensaio, conforme mostrado na Tabela 5.

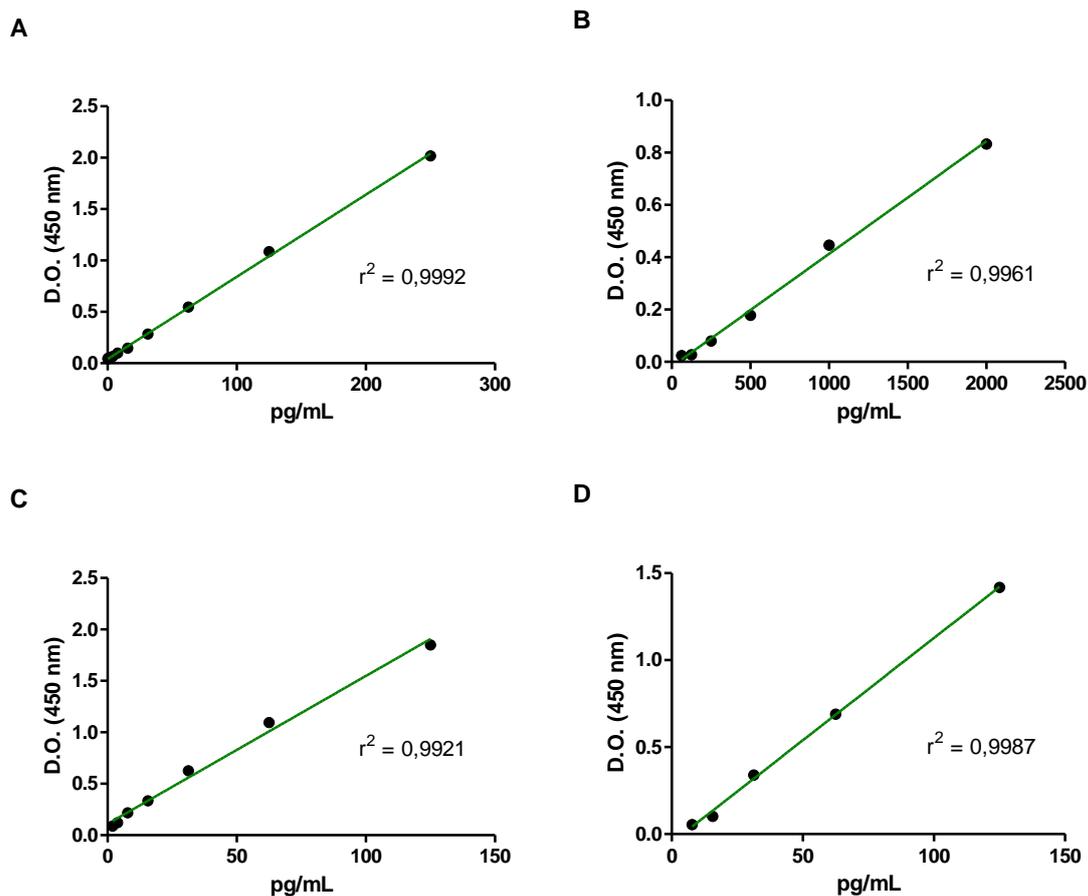


Figura 18: Regressões lineares obtidas a partir de diluições seriadas das citocinas e os respectivos valores de densidade óptica (D.O.) a 450 nm. IL-5 (A), IL-10 (B), TNF- α (C) e IFN- γ (D). O valor de correlação linear (r^2) foi indicado em cada gráfico.

Tabela 5: Valores obtidos de limite de detecção para dosagem de citocinas por ELISA.

Citocina	Limite de detecção (pg/mL)
IL-5	Máximo: 250
	Mínimo: 0,244
IL-10	Máximo: 2000
	Mínimo: 62,5
TNF- α	Máximo: 125
	Mínimo: 1,95
IFN- γ	Máximo: 125
	Mínimo: 7,81

4.3.2. Níveis de citocinas em animais imunossuprimidos

Os experimentos foram realizados com grupos de camundongos A/Sn tratados com 10 mg/L de Dex. A cinética de cada citocina foi realizada pela análise semanal de células específicas de camundongos, estimuladas por dois antígenos de *T. gondii*. Um deles é composto de antígenos totais de taquizoítos (ATL) e o outro, de proteínas liberadas por taquizoítos (ESA). Em todos os experimentos, os grupos I/T_{Dex} foram comparados com os grupos NI e I (controles).

4.3.2.1. Interleucina 5 (IL-5)

Os resultados obtidos indicaram redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-5 durante o tratamento com Dex quando as células foram estimuladas com ATL (Figura 19 A) ou ESA (Figura 19 B). As concentrações de IL-5 encontradas foram menores nos grupos tratados com Dex (I/T_{Dex}) do que no grupo de camundongos sem tratamento imunossupressor (I). Os resultados foram obtidos calculando-se a média entre os animais representativos de cada grupo.

Os valores médios obtidos a partir das células estimuladas com ATL foram: I = 9,35 pg/mL; I/T_{Dex7} = 4,8 pg/mL; I/T_{Dex14} = 2,9 pg/mL; I/T_{Dex21} = 3,47 pg/mL; I/T_{Dex28} = 2,6 pg/mL; I/T_{Dex35} = 3,41 pg/mL; I/T_{Dex42} = 2,04 pg/mL; I/T_{Dex49} = 2,35 pg/mL; e I/T_{Dex56} = 1,97 pg/mL.

Os valores de médios obtidos a partir das células estimuladas com ESA foram: I = 7,72 pg/mL; I/T_{Dex7} = 3,85 pg/mL; I/T_{Dex14} = 5,72 pg/mL; I/T_{Dex21} = 4,47 pg/mL; I/T_{Dex28} = 3,41 pg/mL; I/T_{Dex35} = 3,66 pg/mL; I/T_{Dex42} = 2,97 pg/mL; I/T_{Dex49} = 2,28 pg/mL; e I/T_{Dex56} = 2,16 pg/mL.

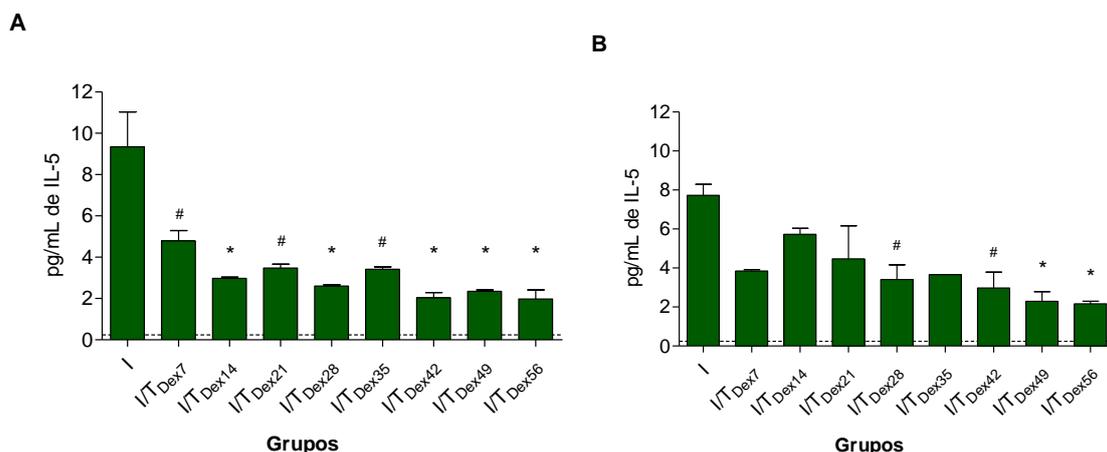


Figura 19: Concentração de IL-5 de esplenócitos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). Os esplenócitos foram estimulados com ATL (A) e ESA (B). A linha tracejada indica o limite de detecção mínimo. * e # diferenças estatisticamente significantes a $*p < 0,0001$ e $\#p < 0,05$ respectivamente.

4.3.2.2. Interleucina 10 (IL-10)

Os resultados obtidos revelaram redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-10 durante o tratamento com Dex tanto quando as células foram estimuladas com ATL (Figura 20 A) ou ESA (Figura 20 B). O tratamento prolongado com Dex resultou em redução da concentração de IL-10 em células estimuladas com ATL e ESA até atingir níveis abaixo do limite de detecção (linha tracejada nas Figuras 20 A e 20 B).

Os valores médios para as células estimuladas com ATL foram: I = 1520,75 pg/mL; I/T_{Dex7} = 1095,75 pg/mL; I/T_{Dex14} = 370,75 pg/mL; I/T_{Dex21} = 323,25 pg/mL; I/T_{Dex28} = 129,50 pg/mL; I/T_{Dex35} = 30,13 pg/mL; I/T_{Dex42} = 31,88 pg/mL; I/T_{Dex49} = 14,13 pg/mL; e I/T_{Dex56} = 7,25 pg/mL.

Os valores médios para as células estimuladas com ESA foram: I = 142,25 pg/mL; I/T_{Dex7} = 36,63 pg/mL; I/T_{Dex14} = 17,75 pg/mL; I/T_{Dex21} = 11,50 pg/mL; I/T_{Dex28} = 14,75 pg/mL; I/T_{Dex35} = 21,83 pg/mL; I/T_{Dex42} = 12,75 pg/mL; I/T_{Dex49} dia = 8,13 pg/mL e I/T_{Dex56} dia = 8,75 pg/mL.

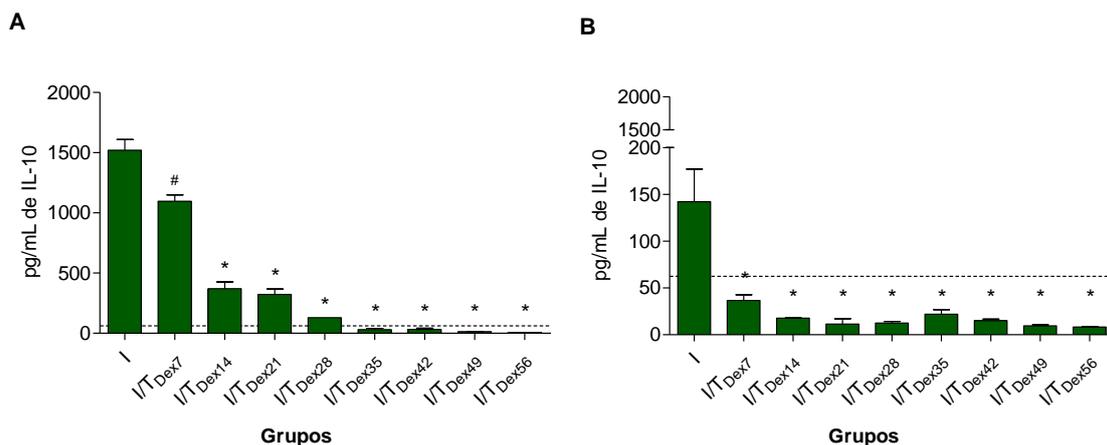


Figura 20: Concentração de IL-10 de esplenócitos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). Os esplenócitos foram estimulados com ATL (A) e ESA (B). A linha tracejada indica o limite de detecção mínimo. * e # diferenças estatisticamente significantes a $p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente.

4.3.2.3. Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)

Observou-se uma redução estatisticamente significativa nas concentrações de TNF- α durante o tratamento com Dex tanto quando as células foram estimuladas com ATL (Figura 21 A) ou ESA (Figura 21 B). Foi possível observar um aumento da concentração de TNF- α nas células estimuladas com ESA no grupo I/T_{Dex42} em relação aos demais grupos I/T_{Dex}, porém não significativo estatisticamente.

Os valores médios para as células estimuladas com ATL foram: I = 104,58 pg/mL; I/T_{Dex7} = 41,79 pg/mL; I/T_{Dex14} = 9,33 pg/mL; I/T_{Dex21} = 9,71 pg/mL; I/T_{Dex28} = 9 pg/mL; I/T_{Dex35} = 24,02 pg/mL; I/T_{Dex42} = 9,47 pg/mL; I/T_{Dex49} = 7,35 pg/mL; e I/T_{Dex56} = 7,77 pg/mL.

Os valores médios para as células estimuladas com ESA foram: I = 63,01pg/mL; I/T_{Dex7} = 15,86pg/mL; I/T_{Dex14} = 9,64 pg/mL; I/T_{Dex21} = 8,32 pg/mL; I/T_{Dex28} = 9,19 pg/mL; I/T_{Dex35} = 11,62 pg/mL; I/T_{Dex42} = 14,09 pg/mL; I/T_{Dex49} dia = 7,21 pg/mL e I/T_{Dex56} = 7,94 pg/mL.

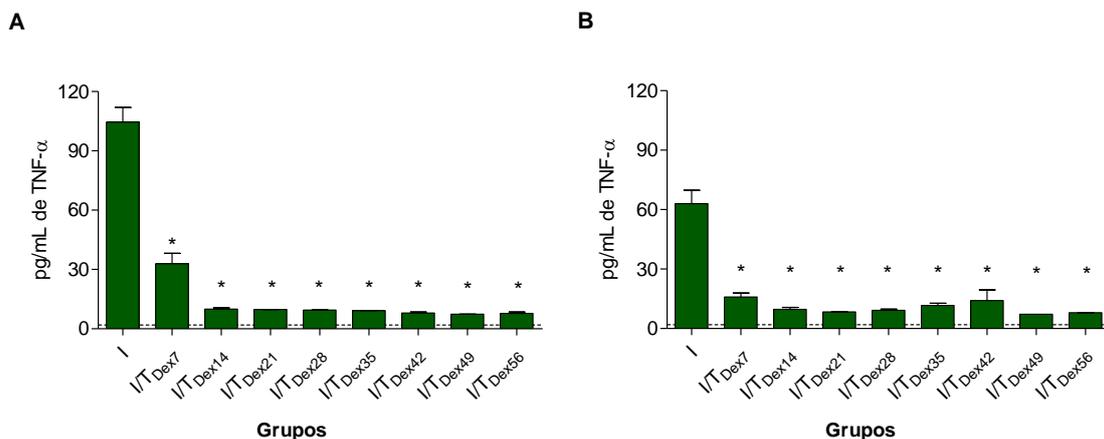


Figura 21: Concentração de TNF- α de esplenócitos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). Os esplenócitos foram estimulados com ATL (A) e ESA (B). A linha tracejada indica o limite de detecção mínimo. * diferença estatisticamente significante a $p < 0,001$.

4.3.2.4. Interferon γ (IFN- γ)

Com relação à dosagem de IFN- γ foram encontrados valores estatisticamente diferentes entre os grupos I/T_{Dex} estimulados com ATL (Figura 22 A) e ESA (Figura 22 B) exceto com relação ao grupo I/T_{Dex7} quando as células foram estimuladas com ATL (Figura 22 A).

Quando estimulados com ATL, observou-se uma redução notável dos níveis de IFN- γ , levando a valores abaixo do nível de detecção (Figura 22 A, linha tracejada).

Os valores médios para as células estimuladas com ATL foram: I = 260,08pg/mL; I/T_{Dex7} = 273,52pg/mL; I/T_{Dex14} = 9,07pg/mL; I/T_{Dex21} dia = 11,14pg/mL e I/T_{Dex28} = 2,08pg/mL.

Os valores médios para as células estimuladas com ESA foram: I = 296,36pg/mL; I/T_{Dex7} = 267,03 pg/mL; I/T_{Dex14} = 35,21/mL; I/T_{Dex21} = 39,15 pg/mL; I/T_{Dex28} = 32,67 pg/mL; I/T_{Dex35} = 137,25 pg/mL; I/T_{Dex42} = 32,54 pg/mL; I/T_{Dex49} = 14,15 pg/mL; e I/T_{Dex56} = 14,87 pg/mL.

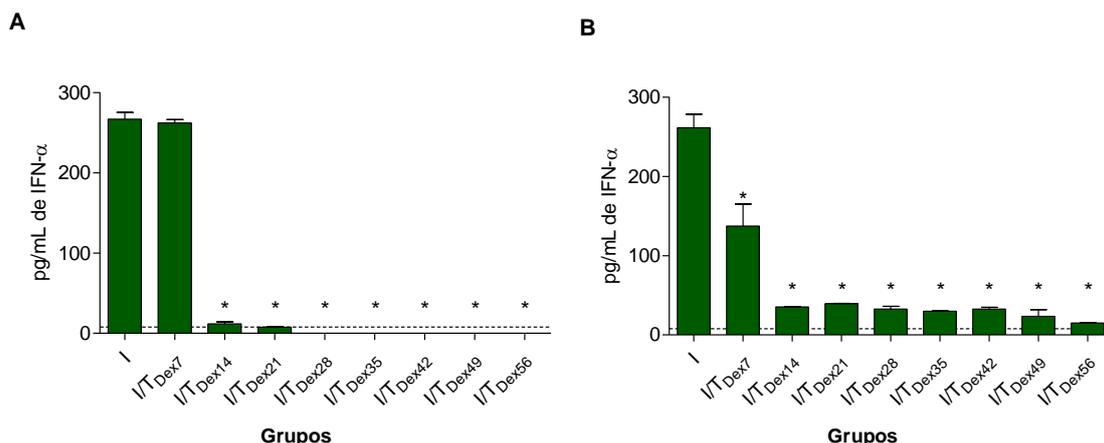


Figura 22: Concentração de IFN- γ de esplenócitos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). Os esplenócitos foram estimulados com ATL (A) e ESA (B). A linha tracejada indica o limite de detecção mínimo. * diferença estatisticamente significativa a $p < 0,001$.

4.4. Níveis de anticorpos e subclasses nos animais imunossuprimidos

As análises das dosagens dos anticorpos IgM, IgG e as subclasses IgG1 e IgG2a foram realizadas em grupos de camundongos infectados com *T. gondii* tratados com Dex 10mg/L (I/T_{Dex}) e comparados com o grupo não tratados (I). Os antígenos ATL e ESA foram testados na placa de ELISA.

4.4.1. Dosagem de anticorpos por ELISA/ATL

A Figura 23 mostra as concentrações dos anticorpos estudados ao longo do tratamento imunossupressor Dex, quando ATL foi testado na ELISA. Os dados foram obtidos calculando-se a média dos animais de cada grupo.

Os valores médios para IgM foram: I = 0,609; I/T_{Dex7} = 0,207; I/T_{Dex14} = 0,225; I/T_{Dex21} = 0,180; I/T_{Dex28} = 0,131; I/T_{Dex35} = 0,121; I/T_{Dex42} = 0,140; I/T_{Dex49} = 0,107 e I/T_{Dex56} = 0,101.

Os anticorpos IgG apresentaram reduções ao longo do tratamento imunossupressor com Dex e foram: I = 1,886; I/T_{Dex7} = 1,478; I/T_{Dex14} = 1,494;

$I/T_{Dex21} = 1,423$; $I/T_{Dex28} = 1,402$; $I/T_{Dex35} = 1,359$; $I/T_{Dex42} = 1,358$; $I/T_{Dex49} = 1,306$ e $I/T_{Dex56} = 1,260$.

As concentrações de anticorpos da subclasse IgG1 apresentaram oscilações ao longo do tratamento. Observou-se uma redução nas duas primeiras semanas (I/T_{Dex7} e I/T_{Dex14}) de tratamento, seguida por um aumento que culminou no 42º dia (I/T_{Dex42}) e progressivamente caiu novamente até o 49º dia de tratamento (I/T_{Dex49}). Os valores foram: $I = 0,959$; $I/T_{Dex7} = 0,438$; $I/T_{Dex14} = 0,279$; $I/T_{Dex21} = 0,211$; $I/T_{Dex28} = 1,402 = 0,177$; $I/T_{Dex35} = 0,242$; $I/T_{Dex42} = 0,185$; $I/T_{Dex49} = 0,167$ e $I/T_{Dex56} = 0,108$.

As concentrações de anticorpos da subclasse IgG2a também apresentaram oscilações ao longo do tratamento, com um aumento entre os grupos tratados com Dex entre 7 e 14 dias (I/T_{Dex7} e I/T_{Dex14}) e subsequente redução e pouca variação até o 56º dia de tratamento (I/T_{Dex56}). Os valores médios foram: $I = 1,219$; $I/T_{Dex7} = 1,134$; $I/T_{Dex14} = 1,216$; $I/T_{Dex21} = 0,844$; $I/T_{Dex28} = 0,919$; $I/T_{Dex35} = 0,725$; $I/T_{Dex42} = 0,724$; $I/T_{Dex49} = 0,694$ e $I/T_{Dex56} = 0,611$.

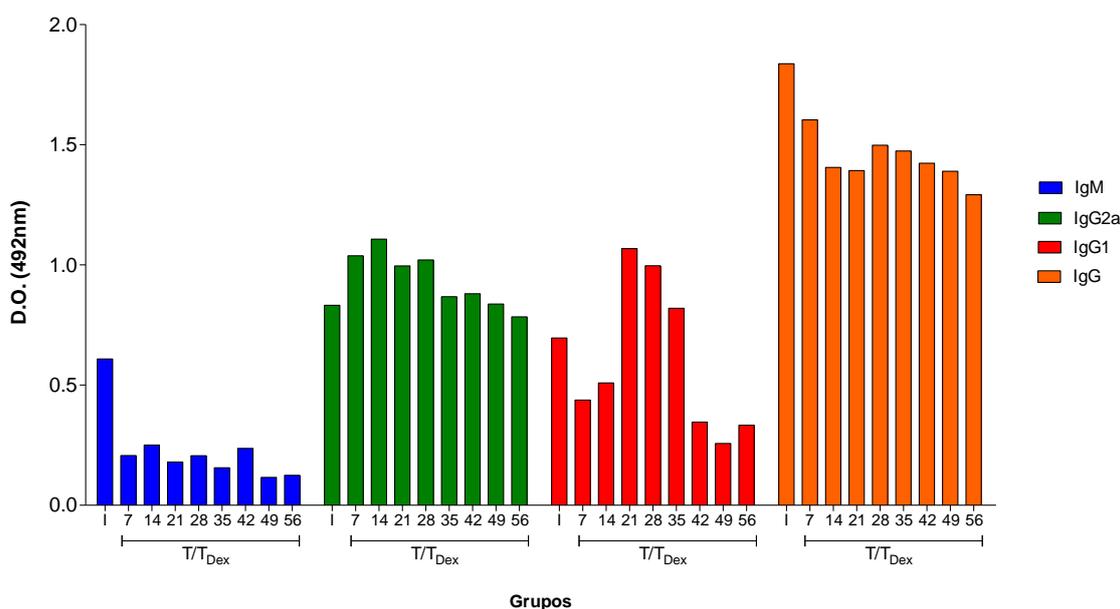


Figura 23: Níveis de anticorpos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). As dosagens foram feitas por ELISA utilizando-se ATL como antígeno.

4.4.2. Dosagem de anticorpos por ELISA/ESA

A Figura 24 mostra as concentrações dos anticorpos estudados ao longo do tratamento imunossupressor Dex, quando ESA foi testado na ELISA. Os dados foram obtidos calculando-se a média dos animais de cada grupo.

As concentrações de IgM apresentaram aumento ao longo do tratamento imunossupressor com ESA. Os valores foram: I = 0; I/T_{Dex7} = 0,036; I/T_{Dex14} = 0,042; I/T_{Dex21} = 0,042; I/T_{Dex28} = 0,05; I/T_{Dex35} = 0,044; I/T_{Dex42} = 0,07; I/T_{Dex49} = 0,053 e I/T_{Dex56} = 0,104.

As concentrações de anticorpos IgG, por sua vez, apresentaram aumento ao longo do tratamento imunossupressor. Os valores médios foram: I = 0,012; I/T_{Dex7} = 0,066; I/T_{Dex14} = 0,072; I/T_{Dex21} = 0,074; I/T_{Dex28} = 0,068; I/T_{Dex35} = 0,072; I/T_{Dex42} = 0,086; I/T_{Dex49} = 0,072 e I/T_{Dex56} = 0,178.

A subclasse IgG1 apresentou aumento progressivo ao longo do tratamento. Os valores médios foram: I = 0,001; I/T_{Dex7} = 0,003; I/T_{Dex14} = 0,011; I/T_{Dex21} = 0,011; I/T_{Dex28} = 0,012; I/T_{Dex35} = 0,013; I/T_{Dex42} = 0,031; I/T_{Dex49} = 0,024 e I/T_{Dex56} = 0,113.

IgG2a apresentou um aumento após o 7º dia de tratamento com Dex (I/T_{Dex7}) seguido por um platô que se seguiu até o 35º dia de tratamento (I/T_{Dex35}) e resultou por fim em uma redução gradativa até o 56º dia de tratamento (I/T_{Dex56}). Os valores médios foram: I = 0,001; I/T_{Dex7} = 0,016; I/T_{Dex14} = 0,022; I/T_{Dex21} = 0,026; I/T_{Dex28} = 0,032; I/T_{Dex35} = 0,018; I/T_{Dex42} = 0,014; I/T_{Dex49} = 0,015 e I/T_{Dex56} = 0,013.

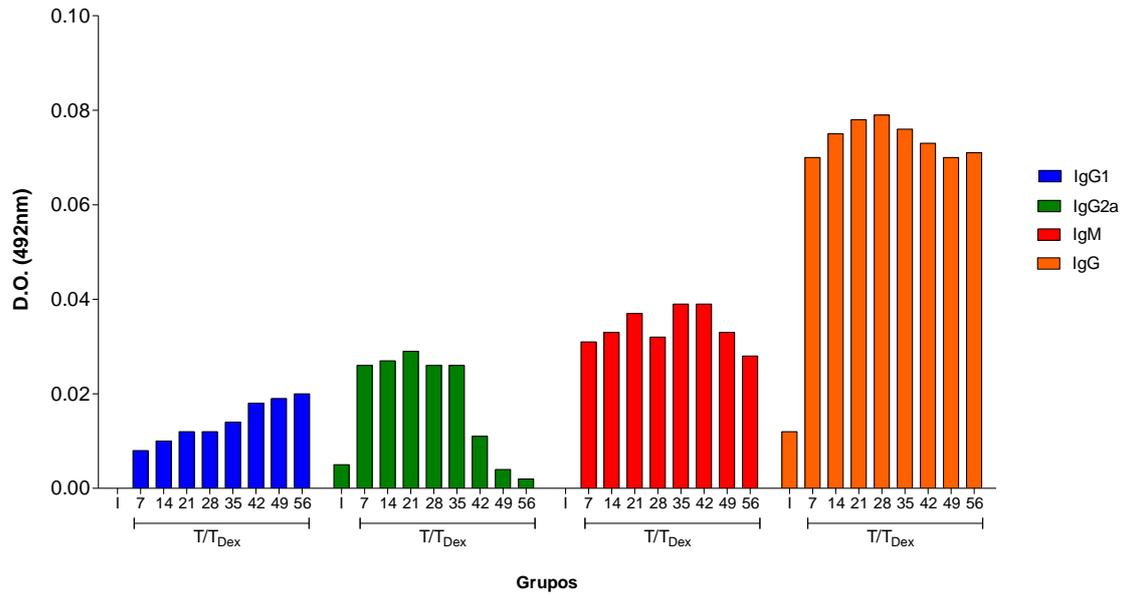


Figura 24: Níveis de anticorpos de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa ME 49) durante tratamento com Dex (10 mg/L). As dosagens foram feitas por ELISA utilizando-se ESA como antígeno.

5. DISCUSSÃO

Os taquizoítos de *T. gondii* causam infecção aguda, se disseminam amplamente em seu hospedeiro e, eventualmente, se diferenciam em formas latentes encistadas chamadas bradizoítos, que se encontram dentro dos cistos teciduais. Durante a infecção latente, sempre que ocorre a transformação em taquizoítos, os parasitas que se desenvolvem são removidos pelo sistema imunológico. Em contraste, os cistos contendo bradizoítos são isolados do sistema imunológico. Na ausência de uma resposta imune efetiva, os organismos liberados que se diferenciam em taquizoítos causam infecção aguda. Os cistos teciduais, portanto, servem de reservatório para a reativação da toxoplasmose quando o hospedeiro se torna imunocomprometido por condições como infecção pelo HIV, transplante de órgãos ou devido à resposta imune prejudicada que ocorre quando os agentes patogênicos são adquiridos no útero (Tu et al. 2017). Portanto, a reativação de estágios crônicos da infecção está relacionada à imunossupressão do hospedeiro. Essa reativação normalmente se apresenta como uma importante doença infecciosa oportunista que acomete principalmente o sistema nervoso central de pacientes com Aids, pacientes transplantados ou sob tratamento contra o câncer (Kang et al, 2006). É descrito que até 40% dos pacientes com Aids são afetados pela toxoplasmose cerebral (TC), uma doença com alta taxa de mortalidade se não tratada (Miller et al., 2009).

A conversão de taquizoítos para bradizoítos desempenha papel crítico na transmissão e patogênese de *T. gondii*. No entanto, os mecanismos moleculares que regem a conversão são desconhecidos. Além desses mecanismos complexos que ocorrem no parasita, o hospedeiro também desempenha um papel importante na determinação da conversão de bradizoítos. Acredita-se que a reativação da toxoplasmose crônica em infecção aguda esteja associada à diminuição da imunidade do hospedeiro (Shen et al., 2016).

Os modelos murinos são os principais meios utilizados para analisar os mecanismos de resistência do hospedeiro à infecção aguda e o

desenvolvimento de toxoplasmose cerebral durante o estágio tardio da infecção. Os camundongos têm sido amplamente empregados como modelos para a toxoplasmose experimental, e já é sabido que a resistência dos camundongos à infecção crônica está relacionada aos fatores genéticos do hospedeiro. Sabe-se que linhagens de camundongos resistentes (por exemplo, BALB/c) estabelecem uma infecção crônica latente, tal como os seres humanos imunocompetentes. Em contraste, as linhagens suscetíveis (por exemplo, C57BL/6) desenvolvem espontaneamente a toxoplasmose cerebral durante a fase final da infecção (Suzuki, 2002). Não está claro se a encefalite nestes camundongos é devida à reativação da infecção, pois ela pode ser causada por uma infecção aguda contínua. Segundo Suzuki (2002), as linhagens resistentes de camundongos podem ser mais adequadas do que as linhagens suscetíveis para reproduzir a infecção crônica. No entanto, a maior parte das informações disponíveis sobre o mecanismo de resistência foi obtida com o uso de linhagens de camundongos suscetíveis (Cardozo-Pereira et al., 2007). Neste trabalho foi utilizada uma linhagem com tendência a suscetibilidade à infecção (Costa-Silva et al., 2008), pois o objetivo era o de estudar a infecção num modelo de imunossupressão.

Os mecanismos de ação das respostas imunes inerentes à toxoplasmose reativada em pacientes imunocomprometidos ou em modelos experimentais imunossuprimidos, não estão totalmente esclarecidos, sobretudo em relação aos padrões de produção de citocinas Th1 / Th2 e de diferentes anticorpos.

Após a infecção crônica ter sido estabelecida, os corticoides (cortisona, hidrocortisona, betametasona, dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona e triancinolona, por exemplo), frequentemente utilizados na terapia humana, induzem imunossupressão. Os camundongos pertencem a uma espécie sensível a esteroides, uma vez que os corticosteroides causam destruição de tecidos linfóides murinos, resultando em linfocitopenia, monocitopenia e redução do baço (Djurkovic-Djakovic e Milenkovic, 2001). Odaert e colaboradores (1996) relataram que a imunossupressão de camundongos por Dex induziu a liberação de parasitas de cistos pré-existent e a formação de novos cistos após 6-12 dias de administração. Ambos os imunossupressores usados no presente trabalho, CsA e Dex, induziram

imunossupressão significativa e subsequente reativação do parasita em animais infectados.

Visando estabelecer um modelo experimental que atendesse à relação *Toxoplasma*/imunossupressão, avaliamos a infecção dos camundongos previamente inoculados com *T. gondii*, via diagnóstico molecular, a fim de nos certificar de que os animais estavam cronicamente infectados. A seguir, padronizamos a contagem de leucócitos utilizando animais sem e com infecção por *T. gondii*. Os animais não infectados apresentaram maior concentração de leucócitos do que os infectados. A imunossupressão com CsA causou significativa redução de leucócitos ainda que diferentes esquemas de tratamento foram aplicados. Independente destes resultados pode se concluir que os diferentes esquemas de tratamento testados não foram tão efetivos. Apesar das porcentagens de imunossupressão próximos a 50% observadas nos grupos NI/T_{CsA20/3x}, NI/T_{CsA50/3x} e NI/T_{CsA20/dia}, foi observado 30% de imunossupressão no grupo de camundongos infectados que receberam CsA na dose de 20 mg/kg em dias consecutivos (grupo I/T_{CsA20/dia}). Em adição, durante os experimentos que envolveram a busca da dose ideal de CsA a ser administrada nos grupos de camundongos cronicamente infectados, houve taxa de mortalidade elevada (dados não mostrados), fato que nos levou a iniciar os experimentos com o imunossupressor Dex.

Guimarães e colaboradores (1997) avaliaram a ação imunossupressora da CsA na infecção experimental por *T. gondii* através da análise da presença do parasito em cortes histológicos dos órgãos afetados. Os autores observaram que todos os animais imunossuprimidos morreram após uma semana de observação e concluíram que o tratamento imunossupressor piorou o desfecho da infecção por *T. gondii*, corroborando os dados obtidos no presente trabalho.

A elevada mortalidade dos camundongos infectados tratados com CsA pode estar relacionada à elevada toxicidade do imunossupressor, tal como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e cardiotoxicidade (Lee, 2010) ou à reativação da toxoplasmose nesses animais, sugerindo que na dose administrada, este medicamento possa ter um efeito acentuado sobre a reativação da toxoplasmose.

O tratamento imunossupressor com Dex 10 mg/L em camundongos crônicos resultou em redução significativa do número de leucócitos/mL, indicando sucesso na imunossupressão. O tratamento por uma semana resultou em 8×10^6 de leucócitos/mL no sangue dos camundongos. Ao final do período avaliado (oitava semana de tratamento) foram encontrados apenas 6×10^4 leucócitos/mL no sangue. Estes resultados mostraram que o efeito imunossupressor da Dex foi superior à CsA.

O risco de reativação da toxoplasmose após a administração de terapia imunossupressora com CsA foi previamente avaliado em camundongos Swiss Webster infectados com a cepa C de *T. gondii* (Sumyuen, Garin, Derouin, 1996). Os autores relaram que a imunossupressão levou à reativação da infecção, corroborando os dados obtidos no presente trabalho.

O tratamento com corticosteroides pode aumentar o risco de infecções, devido aos efeitos inibidores do sistema imunológico e da resposta inflamatória, tornando as infecções por organismos oportunistas até quarenta vezes mais frequentes (Cardozo-Pereira et al., 2007). Tal efeito no sistema imunológico explica os resultados obtidos, uma vez que tais compostos provocam uma grande facilitação a infecções por patógenos como o *T. gondii*, podendo gerar sua reativação.

Saeij e colaboradores (2005) também utilizaram Dex para reativar a infecção por *T. gondii* com a finalidade de observar o crescimento, a disseminação e a reativação da infecção por *T. gondii* usando um sistema de imageamento baseado em bioluminescência. De forma semelhante ao realizado no presente trabalho, os autores dissolveram a Dex a uma concentração de 10 mg/L em água potável, a qual foi dada diariamente aos camundongos. Utilizando a técnica de bioluminescência, os autores também observaram o processo de reativação da infecção por *T. gondii* nos camundongos cronicamente infectados após o tratamento com Dex (Saeij et al., 2005).

A porcentagem de sobrevivência dos animais cronicamente infectados com *T. gondii* e imunossuprimidos com Dex observada no presente trabalho foi de aproximadamente 83%. O tempo médio de sobrevivência dos camundongos tratados com Dex foi decrescendo. Estes resultados podem ser atribuídos à ao aumento da parasitemia. Outra possibilidade seria a possível citotoxicidade

causada pelo tratamento imunossupressor. A imunossupressão de camundongos cronicamente infectados pode resultar na ativação de infecção latente iniciada pelo rompimento de cistos, seguida pela liberação de taquizoítos (Sullivan e Jeffers, 2012).

A imunossupressão dos camundongos crônicos tratados com Dex foi constatada via contagem de leucócitos. Em seguida, a produção de citocinas e anticorpos foi avaliada, a fim de verificar a resposta imune celular e humoral nestes animais. Uma vez que a função imunológica reduzida é provavelmente uma das razões para a reativação da infecção crônica por *T. gondii*, buscou-se determinar as alterações na produção de citocinas em camundongos infectados após o tratamento com Dex. O perfil da síntese de citocinas de células T é diretamente relevante para a regulação da resposta imune, bem como a determinação da resistência relativa ou suscetibilidade ao *T. gondii*.

Nos grupos tratados com Dex, as citocinas avaliadas, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ , tanto estimuladas por ATL quanto por ESA, apresentaram redução dos níveis de concentração ao longo das semanas e em relação ao grupo de camundongos infectados e não tratados. Todas as citocinas dos grupos tratados com Dex apresentaram redução estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado.

O tratamento prolongado com Dex resultou em redução significativa da concentração de IL-10 em células estimuladas com ATL e ESA até atingir níveis abaixo do limite de detecção. Sabe-se que a IL-10 desempenha uma função vital no controle das respostas inflamatórias durante a infecção por *T. gondii* (Kang et al., 2006).

Kang e colaboradores (2006) relataram que as produções de IFN- γ e IL-10 foram acentuadamente aumentadas imediatamente após a infecção por *T. gondii*. Os autores mostraram que as produções de IFN- γ e IL-10 foram acentuadamente aumentadas imediatamente após a infecção por *T. gondii*, mas a produção de IL-4 nos camundongos crônicos permaneceu nos níveis basais até três semanas pós infecção; em seguida, observaram que a produção de IL-4 aumentou ligeiramente. Demonstraram também níveis altos de mRNA de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12 nos cérebros e baços de animais infectados com *T. gondii*, mas níveis baixos de mRNA de IL-4

(Deckert-Schluter et al., 1995). Estes resultados mostram que a infecção por *T. gondii* pode basicamente provocar respostas que tendem para uma resposta tipo Th1.

Segundo Kang e colaboradores (2006), após o tratamento com Dex, a produção de IFN- γ e IL-10 foi significativamente menor, enquanto a produção de IL-4 aumentou significativamente. Estes resultados revelaram que a reativação da toxoplasmose murina induziu uma depressão das respostas imunes Th1; em contrapartida, respostas Th2 foram ativadas. Estes fenômenos indicam que a Dex induziu a imunossupressão de camundongos infectados com *T. gondii* e aumentou a produção de IL-4 significativamente – um promotor principal da resposta Th2 e um regulador da imunidade Th1 (Nickdel et al., 2004). Os dados obtidos por Kang e colaboradores (2006) com relação à INF- γ e IL-10 foram semelhantes aos encontrados no presente trabalho, corroborando nossos achados.

Shen e colaboradores (2016) testaram 20 citocinas e 11 delas, dentre as quais, IL-10, TNF- α e IFN- γ , apresentaram níveis significativamente diminuídos após o tratamento com Dex. IL-5 não apresentou alterações significantes. Estes resultados indicaram que o tratamento com esse agente alterou os níveis de citocinas-chave críticas para o controle da infecção por *T. gondii*, portanto, levando à reativação da infecção. Shen e colaboradores (2016) observaram também que a administração de CsA em camundongos resultou em alterações substanciais em um painel de citocinas. Estes incluíram níveis diminuídos de IL-12 e INF- γ , as principais citocinas pró-inflamatórias que eliminam a toxoplasmose aguda e restringem a infecção na fase crônica.

O INF- γ é considerado um requisito para resistência contra a infecção aguda adquirida por *T. gondii* e para o desenvolvimento da toxoplasmose cerebral durante o estágio tardio da infecção (Suzuki, 2002). Várias populações de células T e não-T são fontes importantes de IFN- γ para conferir resistência à infecção. A IL-12, dentre outras interleucinas, é importante para a regulação positiva da produção de IFN- γ . Como *T. gondii* infecta uma variedade de células hospedeiras, as respostas imunes mediadas por IFN- γ controlam o parasita em células fagocíticas e as não fagocíticas através de diferentes

mecanismos, muito provavelmente dependendo do tipo de células que responde ao IFN- γ (Suzuki, 2002).

A imunidade mediada por células dependente de IFN- γ desempenha um papel importante na resistência a *T. gondii* em linhagens de camundongos resistentes e suscetíveis, embora a imunidade humoral também esteja envolvida. Muitos tipos diferentes de células estão envolvidos na resistência como produtores de IFN- γ e respondedores ao IFN- γ para controlar o parasita. Tipos de células múltiplas também são importantes produtores de IL-12, que é necessária para a indução da produção de IFN- γ (Suzuki, 2002).

A IL-12 é o indutor mais importante da síntese de IFN- γ . A neutralização de IL-12 com anticorpos anti-IL-12 resulta em 100% de mortalidade em camundongos infectados com uma cepa menos virulenta de *T. gondii* em associação com a diminuição da produção de IFN- γ (Gazzinelli et al., 1994). As células dendríticas foram identificadas como a fonte de IL-12 no baço em resposta à infecção por *T. gondii* (Reis e Sousa et al., 1997). Uma vez que a IL-12 é importante para a manutenção da produção de IFN- γ em células T que medeiam a resistência à infecção crônica, as células dendríticas nos cérebros de camundongos infectados podem desempenhar um papel importante na manutenção da produção de IFN- γ pelas células T no cérebro (Suzuki, 2002).

Os neutrófilos, por sua vez, infiltram-se rapidamente na cavidade peritoneal dos camundongos após a infecção intraperitoneal com *T. gondii*. Cerca de 85% dos neutrófilos apresentaram armazenamento intracelular de IL-12 (Bliss et al., 2000). A depleção de neutrófilos durante os primeiros seis dias de infecção resulta num aumento da mortalidade em camundongos em associação com a diminuição da produção de IL-12 e IFN- γ pelos esplenócitos (Bliss et al., 2001). A infiltração rápida de neutrófilos no local de infecção parece desempenhar um papel importante na indução da resposta imune protetora de tipo Th1 contra *T. gondii* durante o estágio inicial da infecção (Suzuki, 2002).

As células T CD8⁺ são as principais efetoras da imunidade celular protetora contra a infecção aguda, embora as células T CD4⁺ também estejam envolvidas. A atividade protetora das células T CD8⁺ é predominantemente

mediada por IFN- γ e estas células parecem ser a fonte principal de IFN- γ durante a fase aguda da infecção (Suzuki, 2002). O IFN- γ também desempenha um papel crítico na prevenção da toxoplasmose cerebral durante o estágio tardio da infecção em camundongos (Gazzinelli et al., 1992). Gazzinelli et al. (1994) relataram que as células T CD4⁺ e T CD8⁺ agem de forma sinérgica para prevenir o desenvolvimento da toxoplasmose cerebral, provavelmente através da produção de IFN- γ . Brown e McLeod (1990) relataram que as células T CD8⁺ estão envolvidas na resistência por meio da regulação do número de cistos de *T. gondii* no cérebro de camundongos.

As células B ou anticorpos são também componentes importantes da resistência adquirida contra *T. gondii*. Contudo, há poucos relatos sobre as respostas das células B e sobre os títulos de anticorpos em modelos experimentais de toxoplasmose. Guk et al. (2005) relataram que a infecção intracelular de linfócitos esplênicos murinos com taquizoítos de *T. gondii* prejudicou sua capacidade de produzir citocinas e imunoglobulinas.

O tratamento com Dex produziu redução nos níveis de concentração dos anticorpos séricos IgM, IgG, IgG1 e IgG2a dos camundongos infectados. Esta redução foi verificada quando o ATL foi utilizado na placa de ELISA como antígeno. Contudo, quando ESA foi utilizado como antígeno na ELISA, os anticorpos apresentaram outro perfil. Exceto para IgM, os níveis de IgG, IgG1 e IgG2a apresentaram quedas sutis nos níveis durante as semanas de tratamento. Estes dados podem ser correlacionados com o que já foi observado em pacientes com toxoplasmose cerebral (Meira et al., 2008). O aumento dos níveis de anticorpos anti-ESA em camundongos imunossuprimidos por Dex sugere que estes anticorpos são produzidos, quando taquizoítos são liberados na circulação sanguínea.

Kang e colaboradores (2006) mostraram que BALB/c infectados com *T. gondii* sem tratamento imunossupressor evidenciaram uma resposta predominantemente polarizada por Th1, enquanto que os camundongos infectados com *T. gondii* tratados com Dex estavam significativamente deprimidos em relação à IgG2a, IgA, IgM, IFN- γ e IL-10, em comparação com os camundongos infectados e sem tratamento imunossupressor. Os dados indicam que a infecção por *T. gondii* provoca basicamente uma tendência para

uma resposta imune Th1; mas, as respostas Th1 foram deprimidas após imunossupressão por Dex, fato que não foi observado nas respostas Th2.

Finalmente, os resultados apresentados demonstram a reativação da infecção murina por *T. gondii*, anteriormente latente, induzida após a administração CsA ou Dex. A elevada mortalidade dos animais tratados foi associada a uma diminuição acentuada do número de leucócitos, em comparação com camundongos infectados não tratados, fato que está relacionado à reativação da infecção por *T. gondii*. A reativação de *T. gondii* pelo tratamento com Dex desencadeou uma resposta imunológica do tipo Th2.

O modelo murino de imunossupressão desenvolvido no presente trabalho constituiu-se de camundongos A/Sn cronicamente infectados com *T. gondii* e posteriormente tratados com Dex 10 mg/L. Tal modelo mostrou-se útil para a investigação da resposta imune celular e humoral frente à infecção por *T. gondii*. Este modelo animal também poderá ser útil para diferentes aplicações, como por exemplo, para a pesquisa de novas terapias para a toxoplasmose em imunocomprometidos e para a compreensão da dinâmica e patologia da reativação da infecção latente.

Os resultados mostraram que houve redução significativa de leucócitos dos camundongos infectados com *T. gondii* a partir da segunda semana de tratamento com Dex. Mesmo assim, o tratamento foi mantido até o 56º dia, para que o efeito a longo prazo da imunossupressão pudesse ser avaliado. Contudo, para outras finalidades, é possível que um tempo menor de tratamento possa ser utilizado, uma vez que ocorre uma redução significativa de leucócitos, bem como de todas as citocinas e anticorpos avaliados.

6. CONCLUSÕES

- A imunossupressão com CsA causou significativa redução de leucócitos, porém, observou-se elevada mortalidade dos camundongos infectados tratados com CsA, o que pode estar relacionada à elevada toxicidade deste imunossupressor.
- Foi estabelecido um modelo experimental para a associação imunossupressão e toxoplasmose: camundongos A/Sn fêmeas infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* e imunossuprimidos com Dex, via oral, na concentração de 10 mg/L, pelo período de 56 dias.
- Os camundongos imunossuprimidos por Dex apresentaram redução significativa da concentração de citocinas IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ .
- Os camundongos imunossuprimidos por Dex apresentaram níveis de anticorpos reduzidos quando analisados com ATL, no entanto, quando analisados em relação ao ESA, apresentaram aumento da concentração de anticorpos.
- O perfil de anticorpos e citocinas desencadeado na infecção por *T. gondii* em camundongos imunossuprimidos por Dex sugeriu uma tendência da resposta celular do tipo Th2, com redução de IL-5.
- O aumento dos níveis de anticorpos anti-ESA em camundongos imunossuprimidos por Dex sugere que estes anticorpos são produzidos, quando taquizoitos são liberados na circulação sanguínea.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi M, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis*. 2003 Aug 15;188(4):608-16.

Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *Int J Parasitol*. 2006 Nov;36(13):1373-82.

Arnold SJ, Kinney MC, McCormick MS, Dummer S, Scott MA. Disseminated toxoplasmosis. Unusual presentations in the immunocompromised host. *Arch Pathol Lab Med*. 1997 Aug;121(8):869-73.

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jan;9(1):55-62.

Barragan A, Hitziger N. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. *Subcell Biochem*. 2008;47:198-207.

Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW, Green JL, Holder AA, Cowman AF. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem*. 2006; 281: 5197-208.

Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A, Del Pezzo M, Di Cristina M 2003. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin Microbiol* 41: 5414–8.

Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol*. 2000 Oct 15;165(8):4515-21.

Bliss SK, Gavrilescu LC, Alcaraz A, Denkers EY. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun*. 2001 Aug;69(8):4898-905.

Bliss SK, Gavrilesco LC, Alcaraz A, Denkers EY. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun*. 2001 Aug;69(8):4898-905

Brown CR, McLeod R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*. 1990 Nov 15;145(10):3438-41.

Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989 Aug;27(8):1787-92.

Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1988 Nov 15;141(10):3584-91.

Cardozo-Pereira AL, Bolzani FCB, Stefani M, Charlín R. Uso sistêmico de corticosteroides: revisão da literatura. *Med Cutan Iber Lat Am* 2007;35(1):35-50

Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol*. 2002 Nov;40(11):4037-44.

Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:656–658

Castellani A. Note on certain Protozoa-like bodies in a case of protracted fever and splenomegaly. *J Trop Med*. 1914;17:113-114.

CDC. Toxoplasmosis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>. Acesso em 28.11.2017.

Chalmers AJ, Kamar A. *Toxoplasma pyrogenes castellani*. *J Trop Med*. 1920;23:45.

Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, Focaccia R, Pereira-Chioccola VL. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (10): 5044-7.

Combe CL, Moretto MM, Schwartzman JD, Gigley JP, Bzik DJ, Khan IA. Lack of IL-15 results in the suboptimal priming of CD4+ T cell response against an intracellular parasite. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Apr 25;103(17):6635-40.

Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol*. 2007 Dec;29(12):651-60.

Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chioccola VL. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol*. 2008; 120(3):227-34.

Costa-Silva TA. Análise da resposta celular e humoral de camundongos A/Sn imunizados com proteínas excretadas/secretadas (ESA) de *Toxoplasma gondii*. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2012. 148 pp.

Costa-Silva TA. Análise do potencial antigênico de proteínas excretadas por taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2008. 102 pp.

Coulon G. Presence d'un nouvel encephalitozoon (*Encephalitozoon brumpti*, n. sp.) dans le liquide cephalorachiden d'un sujet atteint de meningite surrigue. *Ann De Parasitol*. 1929;7:449–452.

Daryani A, Hosseini AZ, Dalimi A. Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Vet Parasitol*. 2003 Apr 18;113(2):123-34.

Deckert-Schlüter M, Albrecht S, Hof H, Wiestler OD, Schlüter D. Dynamics of the intracerebral and splenic cytokine mRNA production in *Toxoplasma gondii*-resistant and -susceptible congenic strains of mice. *Immunology*. 1995 Jul;85(3):408-18.

Decoster A. Detection of IgA anti-P30 (SAG1) antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;219:199-207.

Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Kim L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol Rev.* 2004 Oct;201:191-205.

Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med.* 1974 May 16;290(20):1110-6.

Djurkovic-Djakovic O, Milenkovic V. Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. *Acta Protozool.* 2001;40:99–106.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972 Feb;19(1):155-77.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012 Sep;139(11):1375-424.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012;139:1375–1424.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Apr;11(2):267-99.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998 Jul;28(7):1019-24.

Dubey JP. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier JP (ed). *Parasitic Protozoa*. Vol VI, New York: Academic Press, 1993. p.1-57.

Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*. Second edition, CRC Press, 2010. 336 pp.

Dunay IR, Chan WC, Haynes RK, Sibley LD. Artemisone and artemiside control acute and reactivated toxoplasmosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Oct;53(10):4450-6

Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int J Parasitol.* 2001 Dec;31(14):1699-703.

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* 1999 May 29;353(9167):1829-33.

Engstrom RE, Holland GN, Nussenblatt RB, Jabs DA. Current practices in the management of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 1991;111:601–10.

Eyles D, Coleman N. Synergistic effect of sulphadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Antibiot Chemother.* 1953;3:483–90.

Fedorovitch AI. Hemoparasites trouves dans un cas de fièvre chronique. *Ann Inst Pasteur.* 1916;30:249–250.

Feldman HA, Miller LT. Serological study of toxoplasmosis prevalence. *Am J Hygiene.* 1956;64:320–335.

Ferguson DJ, Hutchison WM, Pettersen E. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Parasitol Res.* 1989;75(8):599-603.

Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol.* 2002 Aug;18(8):355-9.

Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol.* 2004 Mar 9;34(3):347-60.

Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 2004;40(1):71-80.

Flament-Durand J, Coers C, Waelbroeck C, van Geertruyden J, Tousaint C. Toxoplasmic encephalitis and myositis during treatment with immunodepressive drugs. *Acta Clin Belg.* 1967;22:44–54.

French AR, Holroyd EB, Yang L, Kim S, Yokoyama WM. IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation. *Cytokine.* 2006 Sep;35(5-6):229-34.

Frenkel J. K., Nelson B. M., Arias-Stella J. (1975) Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis. *Human Pathol.* 6: 97-111.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 1970 Feb 6;167(3919):893-6.

Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1992 Jul 1;149(1):175-80.

Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol.* 2006 Dec;6(12):895-906.

Gazzinelli RT, Hartley JW, Fredrickson TN, Chattopadhyay SK, Sher A, Morse HC 3rd. Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency: studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Infect Immun.* 1992 Oct;60(10):4394-401.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1994 Sep 15;153(6):2533-43.

Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, Buffolano W, Stanford MR, Petersen E; European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Aug 13;2(8):e277.

Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 1996 Jun;34(6):1506-11.

Guimarães AC, Kawarabayashi M, Nunes EV, Ferraz SN, Chiosini CB, Tolezano JE, Gama-Rodrigues JJ, Okumura M. Experimental toxoplasmosis, and immunosuppression (parasite evaluation and histological alterations). *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1997 Nov-Dec;52(6):316-20.

Guk SM, Kook J, Jeon YH, Choi JH, Han ET, Shin EH, Chai JY. Suppressed cytokine and immunoglobulin secretions by murine splenic lymphocytes infected in vitro with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Parasitol.* 2005 Apr;91(2):467-70.

Hardman, J.G., L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Goodman (eds.). Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 1996, p. 1466.

Hofflin J. M., Conley F. K., Remington J. S. (1987) Murine model of intracerebral toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 155: 550-557.

Hofman P, Bernard E, Michiels JF, Thyss A, Le Fichoux Y, Loubière R. Extracerebral toxoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Pathol Res Pract*. 1993 Sep;189(8):894-901.

Hotez PJ. Neglected infections of poverty in the United States of America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Jun 25;2(6):e256.

Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995 Dec;172(6):1561-6.

Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol*. 1995 Apr;25(4):994-1000.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.

Janků, J., 1923. Pathogenesis and pathologic anatomy of the congenital coloboma of the macula lutea in an eye of normal size, with microscopic detection of parasites in the retina 62, 1021–1027.

Jeklova E, Leva L, Jaglic Z, Faldyna M. Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008 Apr 15;122(3-4):231-40.

Johnson LL. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infect Immun*. 1992 Sep;60(9):3719-24.

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp Parasitol*. 2010 Jan;124(1):10-25.

Jones JL, Sehgal M, Maguire JH. Toxoplasmosis-associated deaths among Human Immunodeficiency Virus-infected persons in the United States, 1992-1998. *Clin Infect Dis*. 2002 Apr 15;34(8):1161.

Kang KN, Choi IU, Shin DW, Lee YH. Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamethasone. *Korean J Parasitol*. 2006 Sep;44(3):209-19

Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol*. 2004 Mar 9;34(3):401-9.

Kodjikian L, Hoigne I, Adam O, Jacquier P, Aebi-Ochsner C, Aebi C, Garweg JG. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Mar;23(3):272-4.

Lacroix C., Brun-Pascaud M., Maslo C., Chau F., Romand S., D rouin F. (1996) Co-infection of *Toxoplasma gondii* with other pathogens: pathogenicity and chemotherapy in animal models. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology. Toxoplasma gondii* (Ed. U. Gross). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 219: 223-233.

Lacroix C., Levacher-Clergeot M., Chau F., Sumyuen M. H., Sinet M., Pocardalo J.J., D rouin F. (1994) Interactions between murine AIDS (MAIDS) and toxoplasmosis in co-infected mice. *Clin. Exp. Immunol.* 98: 190-195.

Lalibert  J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jun;65(12):1900-15.

Lee J. Use of antioxidants to prevent cyclosporine a toxicity. *Toxicol Res.* 2010 Sep;26(3):163-70.

Levaditi C. Au sjet de certaines protozooses hereditaires humaines a localizations oculaires et nerveuses. *C R Soc Biol.* 1928;98:297-299.

Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y. Association of CD4+ T celldependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic 99 susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med.* 1996; 184(2):597-607.

Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y. Association of CD4+ T celldependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic 99 susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med.* 1996; 184(2):597-607.

Liesenfeld O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J Infect Dis.* 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S96-101.

Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. *Parasitology.* 2011 Dec;138(14):1829-31.

Luft BJ, Conley F, Remington JS, Laverdiere M, Wagner KF, Levine JF, Craven PC, Strandberg DA, File TM, Rice N, Meunier-Carpentier F. Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. *Lancet.* 1983 Apr 9;1(8328):781-4.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992 Aug;15(2):211-22.

Mai K, Sharman PA, Walker RA, Katrib M, De Souza D, McConville MJ, Wallach MG, Belli SI, Ferguson DJ, Smith NC. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):281-9.

Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol*. 2008 Jul;57(7):845-50.

Meira CS, Vidal JE, Costa-Silva TA, Frazatti-Gallina N, Pereira-Chiocola VL. Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV-infected patients using *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Nov;71(3):279-85.

Meira, CS. Antígenos excretados/secretados de *Toxoplasma gondii*: resposta imune celular e humoral na toxoplasmose cerebral e Aids. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2013. 149 pp.

Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2009 Jan;39(1):23-39.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003 Feb;73(2):209-12.

Nascimento FS, Suzuki LA, Branco N, Franco RM, Andrade PD, Costa SC, Pedro MN, Rossi CL. *Toxoplasma*-specific IgG subclass antibody response in cerebrospinal fluid samples from patients with cerebral Toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015 Sep-Oct;57(5):439-42.

Nickdel MB, Lyons RE, Roberts F, Brombacher F, Hunter CA, Alexander J, Roberts CW. Intestinal pathology during acute toxoplasmosis is IL-4 dependent and unrelated to parasite burden. *Parasite Immunol*. 2004 Feb;26(2):75-82.

Nicoll S, Wright S, Maley SW, Burns S, Buxton D. A mouse model of recrudescence of *Toxoplasma gondii* infection. *J Med Microbiol.* 1997 Mar;46(3):263-6.

Odaert H., Soete M., Fortier B., Camus D., Dubremetz J. F. (1996) Stage conversion of *Toxoplasma gondii* in mouse brain during infection and immunodepression. *Parasitol. Res.* 82: 28-31.

Paige BH, Cowen D, Wolf A. Toxoplasmic encephalomyelitis. V Further observations of infantile toxoplasmosis; intrauterine inception of the disease; visceral manifestations. *Am J Dis Child.* 1942;63:474–514.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2009 Oct;39(12):1385-94.

Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 2009 Dec;4(10):1363-79.

Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Feb;81(3):908-12.

Pomeroy C., Kline S., Jordan M. C., Filice G. A. (1989) Reactivation of *Toxoplasma gondii* by cytomegalovirus disease in mice: antimicrobial activities of macrophages. *J. Infect. Dis.* 160: 305-311.

Ponnaiyan D, Jegadeesan V. Cyclosporine A: Novel concepts in its role in drug-induced gingival overgrowth. *Dent Res J (Isfahan).* 2015 Nov-Dec;12(6):499-506.

Prigione I, Fachetti P, Lecordier L, Deslée D, Chiesa S, Delawn MFC, et. al. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross – react with live tachyzoites: Characterization of fine antigens specificity of the clones and implication for vaccine development. *J Immunol* 2000; 164: 164: 3741-8.

PubChem Compound 2015 b. Dexamethasone. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5743#section=2D-Structure>. Acesso em: 28.07.2015.

PubChem Compound 2015a. Cyclosporin A. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284373#section=Top>. Acesso em: 28.07.2015.

Rabaud C, May T, Amiel C, Katlama C, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. A French National Survey. *Medicine (Baltimore)*. 1994 Nov;73(6):306-14.

Rabaud C, May T, Lucet JC, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey. *Clin Infect Dis*. 1996 Dec;23(6):1249-54.

Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*. 1997 Dec 1;186(11):1819-29

Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:264–296.

Roberts F, Mets MB, Ferguson DJ, O'Grady R, O'Grady C, Thulliez P, Brézin AP, McLeod R. Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant. *Arch Ophthalmol*. 2001 Jan;119(1):51-8.

Roemer E, Blau IW, Basara N, Kiehl MG, Bischoff M, Günzelmann S, Kirsten D, Sanchez H, Wocker EL, Fauser AA. Toxoplasmosis, a severe complication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: successful treatment strategies during a 5-year single-center experience. *Clin Infect Dis*. 2001 Jan;32(1):E1-8.

Rogers NM, Peh CA, Faull R, Pannell M, Cooper J, Russ GR. Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor. *Transpl Infect Dis*. 2008 Feb;10(1):71-4.

Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol*. 1999 Aug;2(4):426-32.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*) *Science*. 1948;108:660–663.

Sabin AB. Toxoplasmosis. A recently recognized disease of human beings. *Adv Pediatr*. 1942;1:1–53.

Saeij JP, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infect Immun*. 2005 Feb;73(2):695-702.

Sanchez Mejia A, Debrunner M, Cox E, Caldwell R. Acquired toxoplasmosis after orthotopic heart transplantation in a sulfonamide-allergic patient. *Pediatr Cardiol*. 2011 Jan;32(1):91-3.

Shen B, Yuan Y, Cheng J, Pan M, Xia N, Zhang W, Wang Y, Zhou Y, Zhao J. Activation of chronic toxoplasmosis by transportation stress in a mouse model. *Oncotarget*. 2016 Dec 27;7(52):87351-87360.

Shwab EK, Zhu X-Q, Majumdar D, Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014;141:453–461.

Sing-Leung L. An update on immunosuppressive medications in transplantation. *The Hong Kong Medical Diary*. 2001;6 (4):1-6.

Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé M-L, Zhu X-Q, Ajiokag JW, Rosenthalh BM, Dubey JP, Sibley LD. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:5844–5849.

Sullivan WJ Jr, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 May;36(3):717-33.

Sumyuen MH, Garin YJ, Derouin F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol Res*. 1996;82(8):681-6.

Sumyuen MH, Garin YJ, Derouin F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol Res*. 1996;82(8):681-6.

Suzuki Y, Joh K. Effect of the strain of *Toxoplasma gondii* on the development of toxoplasmic encephalitis in mice treated with antibody to interferon-gamma. *Parasitol Res*. 1994;80(2):125-30.

Suzuki Y. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1;186 Suppl 2:S234-40.

Talabani H, Mergey T, Yera H, Delair E, Brézin AP, Langsley G, Dupouy-Camet J. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. *Parasite*. 2010 Sep;17(3):177-82.

Torres CM. Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, *Encephalitozoon chagasi*, N. sp., observe dans un cas de meningo-encephalo-myelite congenitale avec myosite et myocardite. *C R Soc Biol*. 1927;97:1787–1790.

Tu V, Yakubu R, Weiss LM. Observations on bradyzoite biology. *Microbes Infect*. 2017 Dec 26. pii: S1286-4579(17)30225-3.

Unno A, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Kitoh K, Takashima Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int*. 2008 Dec;57(4):515-8.

Vaessen N, Verweij JJ, Spijkerman IJ, van Hoek B, van Lieshout L. Fatal disseminated toxoplasmosis after liver transplantation: improved and early diagnosis by PCR. *Neth J Med*. 2007 Jun;65(6):222-3.

Vallochi AL, Muccioli C, Martins MC, Silveira C, Belfort R Jr, Rizzo LV. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am J Ophthalmol*. 2005 Feb;139(2):350-1.

Watanabe H., Suzuki Y., Makino M., Fujiwara M. (1993) *Toxoplasma gondii*: Introduction of toxoplasmic encephalitis in mice with chronic infection by inoculation of a murine leukemia virus inducing immunodeficiency. *Expl Parasitol*. 76: 39-45.

Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 2009 Jul 1;39(8):895-901.

Wolf A, Cowen D, Paige B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*. 1939a;89:226–227.

Wolf A, Cowen D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull Neur Inst NY*. 1937;6:306–371.

Wong SY, Remington JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*. 1993 Mar;7(3):299-316.

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11

activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1626-9.

ANEXOS

Anexo 1: Parecer da Comissão de Ética Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pausteur



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ / INSTITUTO PASTEUR
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 13 de março de 2013.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur nº 10/2013

Prezada Senhora,

Vimos pelo presente informar que o projeto de **“Estudo da resposta imune celular e humoral desencadeada por *Toxoplasma gondii* em hospedeiros imunossuprimidos”**, sob coordenação da Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola, foi considerado **APROVADO**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

Vale ressaltar que o emprego que a metodologia descrita está adequado para a obtenção das respostas esperadas, o que foi debatido por esta Comissão em conjunto com a responsável para adequação dos procedimentos aos preceitos éticos.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e encaminhar ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,


Adriano Abbud
Coordenador Interino
CEUA-IAL/Pasteur

Ilma. Sra.
Dra. Vera Lucia Pereira Chioccola
Pesquisadores Científicos
Centro de Parasitologia e Micologia
Instituto Adolfo Lutz

AA/aa

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355
10º Andar – Salas 1019/1020 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3068-2881 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br