

ROSANGELA JUNQUEIRA ROCHA



1
Abr. 1996

“Toxoplasmose em camundongos: antígenos específicos na urina e plasma e cistos no cérebro.”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Rosângela Junqueira Rocha</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.

18/12/95 Ana Maria Aparecida Guaraldo

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de concentração de Parasitologia.

Orientador: Prof^{te} Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

1995



9.150.00.00

VIDAS BC
 CH. A:
 T/UNICAMP
 R582t
 Ex.
 MBO BC/27185
 OC. 667196
 C ☐ D ☒
 ECO R\$ 11,00
 DA 30/03/96
 CPD

CM-00086185-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Rocha, Rosangela Junqueira
 R582t Toxoplasmose em camundongos : antígenos específicos
 na urina e plasma e cistos no cérebro / Rosangela
 Junqueira Rocha. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Ana Maria Aparecida Guaraldo.
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas
 Instituto de Biologia.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Toxoplasmose em animais.
 3. Antígenos. 4. Urina. 5. Sangue. 6. Ensaio imunoenzimático.
 I. Guaraldo, Ana Maria Aparecida. II. Universidade Estadual
 de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título..

LOCAL E DATA: Campinas, 18 de dezembro de 1995.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo (Orientador) Ana Maria Aparecida Guaraldo
Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi Cláudio Lúcio Rossi
Assinatura

Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães Eliana Maria Zanotti-Magalhães
Assinatura

Prof. Dr. Rogério de Jesus Pedro Rogério de Jesus Pedro
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor Ricardo Wagner de Almeida Vitor
Assinatura

SUPLENTES

Prof. Dr. Irineu José Barsanti de Camargo Irineu José Barsanti de Camargo
Assinatura

Profa. Dra. Selma Giorgio Selma Giorgio
Assinatura

APROVADA

Trabalho desenvolvido no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e no Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Às crianças que fazem parte da
minha vida: Thaisa Maria, Teotônio,
Rodolfo e Nathália. E à criança que
reside dentro de cada um de nós.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Ana Maria Aparecida Guaraldo que acreditou e confiou na minha proposta de trabalho, pela orientação e serenidade nos momentos difíceis, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. E pela amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi que acompanhou o desenvolvimento desta tese e sem cujo apoio e orientação não teria sido possível sua realização.

Aos Profs. Drs. Nelson da Silva Cordeiro, Eliana Zanotti Magalhães e Irineu José Barsanti de Camargo que fizeram parte da pré-banca desta tese, por suas valiosas sugestões.

À Regina Maura Bueno Franco, Marlene Tiduko Ueta e Rita Avancini, pela amizade.

À Nilda Doris Montes Villanueva, pela realização da análise estatística dos dados experimentais deste trabalho.

Ao Nilson Branco pelo apoio técnico constante na realização deste trabalho e responsabilidade com que assume suas atribuições.

Ao Sr. Geraldo do Nascimento pela manutenção dos animais experimentais no biotério do Departamento de Parasitologia da UNICAMP.

Aos professores do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, que contribuíram para a minha formação acadêmica.

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP que me receberam como se eu fizesse parte da família.

A meus pais e irmãos que sempre compartilharam comigo as alegrias e deram suporte de força e esperança nos momentos difíceis. À Thaisa Maria e ao Teotônio, que são a nossa semente.

Ao Antônio Carlos Andreazza que compartilha minha vida desde o início desta tese, e aos seus filhos Rodolfo e Nathália, que de coração também são meus, pelo apoio incondicional e pelo amor que estamos aprendendo a cultivar juntos.

“...só aos poucos é que o escuro é claro.”

João Guimarães Rosa,
Grande Sertão: Veredas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Animais	12
3.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	12
3.3. Grupos Experimentais	13
3.4. Contagem de taquizoitos	15
3.5. Contagem de cistos	15
3.6. Medidas de cistos	16
3.7. Obtenção de urina e sangue	17
3.8. Dosagem de proteínas	17
3.9. Reação de imunofluorescência indireta (IFI)	18
3.9.1. Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	18
3.9.2. Conjugado	19
3.9.3. A reação de IFI	19
3.10. Imunização de coelho para obtenção de soro policlonal anti- <i>T. gondii</i> .	20
3.10.1. Antígenos solúveis de <i>T. gondii</i> (AgS <i>T. gondii</i>)	20
3.10.2. Imunização de coelho	21
3.11. Fracionamento de soro humano e de coelho com sulfato de amônio	21
3.12. Purificação de imunoglobulinas da classe IgG por cromatografia de troca iônica.	22
3.13. Ligação de antígenos de <i>T. gondii</i> à Sepharose 4B	24
3.14. Cromatografia de afinidade	25
3.15. Elisa para captura de antígenos	26
3.16. Análise estatística	29
3.17. Materiais	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Detecção de antígenos de <i>T. gondii</i> .	31
4.2 Linhagem N de <i>T. gondii</i> .	32
4.2.1. Mortalidade dos animais.	32
4.2.2. Concentração de antígenos na urina.	32

4.3. Linhagem P de <i>T. gondii</i> .	33
4.3.1. Mortalidade dos animais.	33
4.3.2. Concentração de antígenos na urina e plasma.	33
4.3.3. Peso dos animais.	34
4.3.4. Título de anticorpos.	35
4.3.5. Número de cistos no cérebro.	36
4.3.6. Volume de cistos no cérebro.	37
4.3.7. Tabela e Figuras.	38
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	63
7. ANEXO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO.

Para a detecção de antígenos de *T. gondii* na urina e plasma de camundongos infectados com o parasito foi utilizada técnica de ELISA de captura. Na técnica, IgG humana anti-*T. gondii*, obtida por cromatografia de afinidade, foi utilizada para o revestimento da placa de ELISA com o intuito de capturar antígenos específicos. Nas reações positivas, os antígenos de *T. gondii* foram reconhecidos por IgG de coelho anti-*T. gondii* obtida por cromatografia de afinidade. Utilizou-se o conjugado IgG de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase e como substrato a ortofenilenodiamina. Em cada placa de reação foram incluídos padrões contendo concentrações conhecidas de proteínas de taquizoitos (AgS *T. gondii*). A concentração de proteínas presentes nas amostras testadas foram expressas em µg/ml. A técnica evidenciou alta reprodutibilidade, com limite inferior de sensibilidade de 0,05 µg/ml. Foi observada antigenúria em camundongos inoculados com 1000, 25000, 50000 e 100000 taquizoitos da linhagem N de alta virulência de *Toxoplasma gondii*, durante a fase aguda da infecção. Camundongos inoculados com 1, 6 ou 12 cistos da linhagem P de moderada virulência de *T. gondii* apresentaram antigenúria e antigenemia na fase aguda e crônica da infecção. Os primeiros cistos foram detectados no cérebro dos camundongos infectados com a linhagem P, 11 dias após a infecção. O número de cistos e o volume médio aumenta com o tempo de infecção, independentemente do número de cistos inoculados. Na fase crônica da infecção dos animais observou-se a ocorrência simultânea de cistos grandes e pequenos, indicando neoformação de cistos. A neoformação de cistos e antigenúria na fase crônica da infecção, indicam a possibilidade de reagudização periódica da infecção pelo *T. gondii*.

1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é protozoário intracelular obrigatório e multiplica-se em qualquer célula nucleada do organismo. Possui ciclo heteroxênico facultativo em que o gato e outros felídeos são os hospedeiros definitivos e outros mamíferos e aves, atuam como hospedeiros intermediários. Os taquizoitos de *T. gondii* já foram demonstrados em líquidos corporais e secreções, humanas e de animais, tais como leite, saliva, urina, sêmen e liquor (SACKS *et alii*, 1982; DUBEY *et alii*, 1980; CHIARI & NEVES, 1984; VITOR *et alii*, 1991; TERRAGNA *et alii*, 1981; CATHIE, 1954; AMENDOEIRA & COUTINHO, 1982; JACOBS *et alii*, 1966; DUBEY & SHARMA, 1980; SABIN, 1941; GUIMARÃES, 1943; ROCHA *et alii*, 1993; CARMELLO *et alii*, 1993).

As infecções por *T. gondii* são, em geral, assintomáticas ou apresentam sintomas inespecíficos (KOSKINIEMI *et alii*, 1989), embora este parasito tenha se mostrado um patógeno oportunista fatal em pacientes aidéticos, uma vez que 30 a 50% destes pacientes apresentam reativação na fase crônica, desenvolvendo quadro agudo de encefalite, miocardite e /ou pneumonia (LUFT & REMINGTON, 1992). Das infecções maternas agudas, 40% resultam em doença congênita no feto (DESMONTS & COUVREUR, 1974)

A patogenicidade de diferentes linhagens de *T. gondii* varia dependendo de fatores do hospedeiro e do parasito. Entre as propriedades do hospedeiro, consideradas extrínsecas ao parasito, são descritas características genéticas (ARAÚJO *et alii*, 1976; WILLIAMS *et alii*, 1978), status imunológico e idade (GARDNER & REMINGTON, 1977). São consideradas propriedades intrínsecas de virulência do parasito, o estágio, a via de inoculação, a dose de infecção (DUBEY & FRENKEL, 1973), a invasividade, a taxa de multiplicação (KAUFMAN *et alii*, 1958) e a cistogenicidade (OMATA *et alii*, 1987). As linhagens de alta virulência matam os camundongos na fase aguda, geralmente até 10 dias após a infecção, independente do número de parasitas inoculados. Geralmente não produzem cistos teciduais, mesmo quando os animais são tratados e sobrevivem à fase aguda da infecção. Linhagens de baixa virulência são aquelas que promovem uma infecção assintomática em camundongos, evoluindo para a fase crônica geralmente sem mortalidade e com formação de cistos teciduais. As linhagens do parasita consideradas subaguda ou de moderada virulência apresentam um perfil intermediário de patogenicidade para camundongos, onde alguns animais morrem durante a fase aguda e outros evoluem para a fase crônica, com formação de cistos. Neste contexto,

o fenômeno da virulência só pode ser compreendido à luz da interação parasito-hospedeiro.

Vários autores têm procurado caracterizar as linhagens de alta e baixa virulência do *T. gondii* através de parâmetros bioquímicos, genéticos e imunológicos. A caracterização genética pela análise isoenzimática de linhagens, mostra que as linhagens de alta virulência são genotípicamente idênticas, e as de baixa virulência são polimórficas (BARNERT *et alii*, 1988; DARDÉ *et alii*, 1988; DARDÉ *et alii*, 1992; CRISTINA *et alii*, 1991; SIBLEY & BOOTHROYD, 1992). Por outro lado, os estudos imunológicos dos principais antígenos de membrana não demonstram variação significativa entre diferentes linhagens de *T. gondii* (HANDMAN *et alii*, 1980; HANDMAN & REMINGTON, 1980). Taquizoitos e bradizoitos possuem antígenos comuns (DARCY *et alii*, 1990; TORPIER *et alii*, 1993; WOODISON & SMITH, 1990), com similaridades entre as estruturas primárias de suas proteínas (CESBROW-DELAUW *et alii*, 1994).

A proliferação dos taquizoitos ocorre durante a fase ativa da infecção, aguda ou reagudizada, com consequente destruição celular e comprometimento tissular. É nesta fase que podem ocorrer os sintomas, que são inespecíficos. O diagnóstico etiológico nestes casos é crucial para o

tratamento adequado. As drogas atualmente disponíveis são eficazes no tratamento da toxoplasmose na fase proliferativa, mas não agem sobre as formas encistadas do parasito (HUDSON, 1993).

Na toxoplasmose o diagnóstico deve evidenciar a fase ativa da infecção. Entretanto, a demonstração direta de formas proliferativas do parasito em líquidos corporais através do exame à fresco ou após coloração, é de baixa eficiência, principalmente quando não se suspeita da etiologia da infecção (BOTTONNE, 1991).

O isolamento do parasito através da inoculação de material biológico em camundongos, é uma técnica específica, utilizada em casos especiais, como no diagnóstico prenatal da infecção congênita e em líquidos corporais de aidéticos (DESMONTS *et alii*, 1985; DIEGO *et alii*, 1993). No primeiro caso, é realizada a inoculação de amostras de líquido amniótico e/ou sangue do cordão umbilical e no segundo, líquidos corporais. Por outro lado, a desvantagem desta técnica é a necessidade da utilização de animais de laboratório, além de requerer 4 a 6 semanas para comprovação do diagnóstico (REMINGTON & DESMONTS, 1990).

As formas proliferativas do *T. gondii* podem também ser demonstradas em cortes histológicos, através de técnicas histoquímicas de peroxidase-anti-

peroxidase (PAP). Tanto formas íntegras do parasito, quanto fragmentos podem ser detectados. Trata-se de uma técnica útil, uma vez que é muito difícil demonstrar o parasito em estudo histopatológico utilizando colorações rotineiras (FRENKEL *et alii*, 1975). Entretanto, sua utilização é restrita, porque exige procedimentos invasivos (CONLEY *et alii*, 1981; HUANG & CHOU, 1988).

Entre os métodos indiretos, a demonstração de anticorpos circulantes é mais comumente utilizada para diagnóstico da infecção por *T. gondii*. Embora altos níveis de anticorpos ocorram durante a fase aguda da infecção, é necessário demonstrar a elevação significativa de títulos de anticorpos da classe IgG em amostras obtidas com intervalo de 2 a 3 semanas ou a presença de anticorpos IgM específicos. Considerados como indicadores de fases aguda, anticorpos IgM podem persistir no soro por mais de um ano após o início da infecção, complicando a interpretação dos resultados (DECOSTER *et alii*, 1988). Além disso, em condições clínicas de imunocomprometimento, é raro o aumento dos níveis dos títulos de anticorpos ou o aparecimento de resposta IgM específica (HAKES & ARMSTRONG, 1983; LUFT & REMINGTON, 1992).

A demonstração de antígenos ou DNA do parasito em líquidos e secreções corporais, surge como alternativa para comprovar a ocorrência de uma infecção ativa sem a necessidade de recorrer a métodos invasivos.

Vários estudos estão sendo desenvolvidos para utilização da técnica de ELISA para captura de antígenos parasitários na urina e outros líquidos corporais humanos (ESPINO *et alii*, 1990; FREIJLIJ *et alii*, 1987; UNGAR, 1990; WATT *et alii*, 1986; GOLDIN *et alii*, 1993). Nas infecções por *T. gondii*, antígenos do parasito já foram demonstrados no sangue circulante e na urina de organismos natural e experimentalmente infectados (HASSL *et alii*, 1988a; HASSL *et alii*, 1988b; LAPPIN *et alii*, 1989; HUSKINSON *et alii*, 1989; FACHADO *et alii*, 1990; HAFID *et alii*, 1992).

A detecção de antígenos na urina de animais experimentalmente infectados com *T. gondii* foi demonstrada utilizando as técnicas de coaglutinação (FACHADO *et alii*, 1990) e ELISA (HUSKINSON *et alii*, 1989). Estes estudos foram realizados em camundongos experimentalmente infectados com uma linhagem de alta virulência do parasito, durante a fase aguda da infecção. Entretanto, não se conhece a dinâmica de eliminação de antígenos na fase crônica da toxoplasmose.

Há evidências de que novos cistos são formados durante a fase crônica da infecção por *Toxoplasma gondii*, a partir de formas do parasito chegando ao cérebro a intervalos intermitentes, devido a episódios recorrentes de parasitemia (CONLEY & JENKINS, 1981) ou a partir da liberação de bradizoitos sem ruptura de cistos (WONG & REMINGTON, 1993).

A determinação do número de cistos no cérebro tem sido usada no estudo da genética da resistência ao *T. gondii* (BROWN & McLEOD, 1990), da reativação da infecção durante a fase crônica (FERGUSON & HUSTCHISON, 1987) e na imunoterapia experimental (SUZUKI *et alii*, 1994).

A reativação da toxoplasmose na fase crônica ainda é um fenômeno pouco esclarecido. A detecção de antígenos na urina e plasma pode ser parâmetro útil para avaliar a ocorrência de reativação da infecção em hospedeiros imunocompetentes. A análise concomitante do volume de cistos no cérebro pode também contribuir para compreensão deste fenômeno.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Verificar a ocorrência de antígenos na urina e sangue durante a fase aguda e crônica da infecção experimental de camundongos com *T. gondii* . Para atingir este objetivo será desenvolvido o método de ELISA para captura de antígenos específicos de *Toxoplasma gondii* .
- Verificar se o volume de cistos é um bom parâmetro para avaliar a neoformação de cistos durante a infecção pelo *Toxoplasma gondii* .

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos heterogenéticos da linhagem Swiss, com idade aproximada de 30 dias, foram adotados como modelo de experimentação. Os camundongos, livres de patógenos específicos, foram produzidos no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.2 *Toxoplasma gondii*

Duas linhagens de *Toxoplasma gondii* foram utilizadas para inoculação dos animais: a linhagem P (moderada virulência) e a linhagem N (alta virulência).

A linhagem P foi isolada do pulmão de um cão em 1978 pela Prof^a. Lígia F. Jamra, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Esta linhagem é mantida em laboratório pela inoculação intraperitoneal de cistos, a cada 2 meses, em camundongos.

A linhagem N foi gentilmente cedida pelo Dr. Mario Camargo do Laboratório Fleury SP em 1992. Esta linhagem é mantida por passagem sucessiva de taquizoitos via intraperitoneal, em camundongos. Os

camundongos são inoculados com taquizoitos e após 48 hs de infecção, os mesmos são recuperados pela inoculação de 4 ml de SST 0,11M pH 7,2 na cavidade peritoneal dos camundongos, com o auxílio de seringa e agulha estéreis. O exsudato rico em taquizoitos é então aspirado, examinado e inoculado em camundongos, via intraperitoneal.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.

As amostras de urina e/ou sangue dos camundongos experimentalmente infectados com *T. gondii*, foram obtidas a diferentes intervalos de tempo após a infecção com o parasito. O dia da infecção foi considerado o dia zero do período experimental.

Foram utilizados dois protocolos básicos:

Protocolo 1- Os camundongos foram separados em 5 gaiolas e inoculados com taquizoitos da cepa N obtidos como descrito no item 3.4: solução salina tamponada com fosfato (SST) 0,11M pH 7,2 (10 camundongos); 1000 taquizoitos (10 camundongos); 25000 taquizoitos (8 camundongos); 50000 taquizoitos (8 camundongos) e 100000 taquizoitos (10

camundongos). As amostras de urina dos animais foram coletadas a cada dois dias, até a sua morte.

Protocolo 2 - Os camundongos foram distribuídos em gaiolas (8 animais por gaiola) e inoculados com 1, 6 ou 12 cistos da linhagem P ou com SST 0,01M pH=7,2 via intraperitoneal. Foram constituídos dois grupos de animais para cada inoculo: de um grupo coletou-se apenas urina (animais não sangrados- ANS) e do outro urina e sangue (animais sangrados - AS). A coleta de urina e sangue, assim como a pesagem dos animais seguiu o seguinte esquema: de 2 em 2 dias, até 32 dias após a infecção; de 4 em 4 dias de 32 a 68 dias após a infecção e de 7 em 7 dias de 68 a 103 dias após a infecção. Após a última coleta, os animais que sobreviveram à fase aguda da infecção foram sacrificados. A mortalidade dos animais também foi registrada.

Os animais sacrificados no final do experimento ou no curso da infecção, foram examinados e o número de cistos no cérebro estimado conforme descrito no item 3.5. Os cistos foram medidos conforme item 3.6.

O protocolo aplicado aos animais de cada gaiola foi determinado por sorteio, para aleatorização dos dados.

3.4 CONTAGEM DE TAQUIZOITOS

Para inoculação dos animais experimentais (item 3.3, protocolo 1), os taquizoitos foram recuperados da cavidade peritoneal de camundongos previamente inoculados com a linhagem N de *T. gondii*, como descrito no item 3.2. A quantidade de taquizoitos presentes foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer.

3.5 CONTAGEM DE CISTOS -

O número de cistos foi estimado no cérebro de animais sacrificados ou mortos durante os experimentos com os animais inoculados com cistos da linhagem P (protocolo 2 - item 3.3). O cérebro de cada animal foi macerado em 1,0 ml de SST 0,11 M pH=7,2 em tubo de hemólise, usando bastão de vidro. Para determinar o número de cistos, 10 µl do macerado do cérebro de cada animal foram examinados, a fresco, entre lâmina e lamínula (20x20mm), com objetiva de 10x de aumento em microscópio óptico. Para a contagem dos cistos foram examinados todos os campos da lamínula. Foram examinadas duas amostras por animal. Os resultados foram expressos pela média do número de cistos presentes nas duas aliquotas examinadas.

3.6. MEDIDAS DE CISTOS

Para a medida dos cistos foram realizados, em duplicata, esfregaços de 10 µl de macerado de cérebro (item 3.5), posteriormente corados pelo Giemsa. Os cistos foram medidos em esfregaços, com objetiva de 100x, em microscópio óptico acoplado à câmara clara e mesa digitalizadora ligada ao computador. Todos os cistos presentes no esfregaço foram medidos. De cada cisto foram tomadas medidas de comprimento e largura. Estas medidas foram transformadas em micrômetros, utilizando-se padrões de 10 µm de lâmina micrométrica Zeiss, nas mesmas condições em que foram feitas as medidas de cistos.

As medidas de comprimento e largura foram usadas para estimar o volume de cada cisto, segundo a fórmula $V=(\pi/6)A.B.C$, onde: A=comprimento, B=largura e C=espessura. Na impossibilidade de obter medidas de espessura de cistos, assumiu-se $C=B$, de acordo com MELLO & VIDAL (1980).

3.7. OBTENÇÃO DE URINA E SANGUE

A emissão da urina dos camundongos foi induzida por pressão externa sobre a bexiga dos animais. As amostras de urina dos animais de cada grupo, foram misturadas e centrifugadas a 1030.g, por 15 minutos, à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e estocado a -18°C, até o momento do uso.

O sangue dos camundongos foi colhido através do plexo orbital utilizando pipeta Pasteur heparinizada. O plasma foi separado mediante centrifugação, a 670.g, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o material foi mantido a -18° C, até o uso.

3.8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.

Todas as concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Lowry, modificado por HARTREE (1972).

3.9. REAÇÃO DE IMUNOFLUORÊSCENCIA INDIRETA (IFI).

3.9.1. ANTÍGENOS DE *Toxoplasma gondii*

Os taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, obtidos de exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados com parasitos da linhagem N, foram lavados, por centrifugação, 3 vezes com SST 0,11M pH=7,2, a 450.g, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Ao sedimento resultante da última lavagem, foi acrescentado SST 0,11M pH=7,2 contendo 2% de formol. O material foi deixado, durante 20 a 30 minutos, à temperatura ambiente, com agitação periódica. Em seguida, o material foi lavado 5 vezes em SST 0,11M pH=7,2, a 450.g, por 15 minutos e o sedimento da última lavagem ressuspensionado em SST 0,11M pH=7,2 contendo 0,1% de soro albumina bovina (SAB). O antígeno foi diluído com SST 0,11M pH=7,2 de modo que após distribuição em lâminas de imunofluorescência, apresentasse em média 30 a 40 taquizoitos por campo (objetiva 40x). Após secagem, à temperatura ambiente, as lâminas foram devidamente embaladas e mantidas a -18°C até o momento do uso. O armazenamento das lâminas nunca ultrapassou 6 meses.

3.9.2. CONJUGADO - Para a reação de IFI, utilizou-se como conjugado IgG de coelho anti-imunoglobulina total de camundongo, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ricardo W. A. Vitor, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Belo Horizonte. O título ótimo do conjugado foi determinado por titulação em bloco.

3.9.3 A REAÇÃO DE IFI

Para a detecção de anticorpos circulantes, foram realizadas reações de IFI como descrito por CAMARGO (1966) com algumas modificações. Resumidamente, os plasma testados foram diluídos a partir de 1:16 em SST 0,11M pH=7,2 e 10 µl de cada diluição foram aplicados aos círculos delimitados das lâminas de imunofluorescência contendo os taquizoitos de *T. gondii*. Após incubação, por 45 minutos, a 37°C, as lâminas foram lavadas 3 vezes por imersão em cubas de vidro contendo SST 0,11M pH=7,2. Após a última lavagem, as lâminas foram secas e 10 µl do conjugado IgG de coelho anti imunoglobulina total de camundongo (item 3.9.2) diluído a 1:80 em SST 0,11M pH=7,2, contendo azul de Evans (0,01%) foram adicionados a cada círculo. As lâminas foram incubadas e lavadas como já descrito. Após

secagem, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada pH=9,5 com lamínula 24X50mm para leitura em microscópio de fluorescência, utilizando-se objetiva 40x (Microscópio Carl Zeiss, com epi-iluminação).

Em todas as lâminas de reação foram incluídos controles positivo e negativo.

3.10. IMUNIZAÇÃO DE COELHO PARA OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL ANTI-*T. gondii*

3.10.1. ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *T. gondii*. (AgS *T. gondii*)

Os taquizoitos de *T. gondii* obtidos de exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados com parasitos da linhagem N, foram lavados, por centrifugação, 3 vezes com SST 0,11M pH=7,2, a 2800.g, por 5 minutos, a 4°C. Após a última lavagem, o precipitado foi ressuscitado em 5 ml de SST 0,11M pH=7,2. O material foi sonificado, em banho de gelo, por três minutos (1 minuto sonicação/1 minuto de pausa) em Sonicador Branson Sonomax, modelo SX-30 - com ciclo pulsado e potência 3,5. Após a sonicação, o material foi mantido sob agitação contínua, a 4°C, por 2 horas e a seguir centrifugado, a 2800.g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante, contendo os AgS *T. gondii*, foi cuidadosamente separado. Após determinação da

concentração de proteínas, o material foi mantido a -18°C até o momento do uso.

3.10.2. IMUNIZAÇÃO DE COELHO

Coelhos foram inoculados com AgS *T. gondii* (1 mg/ml), emulsionado (v:v) com 1 ml de adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA), na região dos gânglios popliteos das patas posteriores. Após 3 semanas, os coelhos foram inoculados nos mesmos locais com 0,25 mg do antígeno emulsionado em 1 ml de adjuvante incompleto de Freund. Após dez dias, os coelhos foram sangrados por punção cardíaca. Os soros, apresentando títulos maiores do que 1/8000 por IFI, foram aliquotados e conservados a -18°C até o uso.

3.11. FRACIONAMENTO DE SORO HUMANO E DE COELHO COM SULFATO DE AMÔNIO.

Seis soros humanos apresentando títulos IgG anti-*T. gondii* por IFI $> 1/32000$ (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi, do Departamento e Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da

Unicamp), foram misturados e a fração globulina foi precipitada com uma solução de sulfato de amônio saturado, como segue: Para cada volume do pool de soros humanos foi adicionado $\frac{1}{2}$ volume de solução saturada de sulfato de amônio, gota a gota. O material foi mantido sob agitação contínua, por 2 $\frac{1}{2}$ horas, à temperatura ambiente. Após este período, o material foi centrifugado, a 1000.g, por 20 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em solução NaCl 0,15M e dialisado, a 4°C, por 48 horas contra salina 0,15M e por 96 horas contra tampão fosfato de sódio 0,0175M pH=6,3 com trocas do tampão a cada 8 horas aproximadamente. O material foi centrifugado a 1000.g por 15 minutos a 4°C, para remover o precipitado. Uma alíquota foi retirada para dosagem de proteínas e o restante do material foi mantido a -18° C até o uso.

O mesmo procedimento foi realizado com o soro de coelho imunizado com AgS *T. gondii* (item 3.10.2).

3.12 - PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DA CLASSE IgG POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

As globulinas da classe IgG do soro humano e de coelho (item 3.11) foram isoladas através de cromatografia de troca iônica em colunas de

DEAE celulose, como descrito por GARVEY *et alii* (1977), com pequenas modificações:

Trinta e cinco (35) gramas de DEAE celulose (Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA) foram homogeneizadas com 700 ml de água destilada e o material foi mantido em repouso, 1h, à temperatura ambiente. Após decantação do fluido, acrescentou-se 1L de NaOH 0,5M à resina e o material foi deixado por 40 minutos, à temperatura ambiente, com agitação ocasional. A resina foi, então, lavada exaustivamente com água destilada antes de ser equilibrada e empacotada com tampão fosfato de sódio 0,0175M pH=6,3, (tampão de equilíbrio).

As preparações obtidas por precipitação com sulfato de amônio (item 3.10), foram aplicadas à coluna de DEAE celulose (1,9 x 38,5cm). Após a aplicação da fração globulínica, continuou-se adicionando o tampão de equilíbrio e o efluente foi coletado em frações de 3 ml/tubo, sendo as absorbâncias lidas a 280 nm em espectrofotômetro de luz ultravioleta até obter-se frações com densidade óptica igual a zero (Anexo - Figuras 1 e 2). As frações nas quais as densidades ópticas foram maiores que zero foram agrupadas e a amostra final foi concentrada por

ultrafiltração a vácuo, usando membrana capaz de reter moléculas com pesos moleculares maiores do que 10.000 daltons (filtros imersíveis CX 10, Millipore Corp. Massachusetts, USA).

A concentração de proteína foi determinada e as amostras foram mantidas a -18°C , até separação dos anticorpos específicos por cromatografia de afinidade.

3.13. LIGAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *T. GONDII* À SEPHAROSE 4B.

O AgS *T. gondii* (item 3.9.1) foi ligado à Sepharose 4B (Pharmacia Biotech), segundo técnica descrita por GARVEY *et alii* (1977). Resumidamente, 3 ml de gel (Sepharose 4B) foram lavados com água destilada em funil com placa porosa à vácuo. O gel foi, então, transferido para um bequer e adicionou-se ao mesmo 5 ml de Na_2CO_3 2M. Paralelamente foram misturados 3 ml de acetonitrila (Carlo Erba 0,1 H₂O) e 1,2 g de brometo de cianogênio. Esta mistura foi adicionada, gota a gota, ao gel, em banho de gelo, sob agitação contínua, para ativação do mesmo. Após 13 minutos, o gel foi transferido para funil com placa porosa e lavado, sequencialmente, com as seguintes soluções: tampão carbonato 0,1M,

pH=9,7, contendo 0,5M de NaCl; água destilada e tampão carbonato 0,1M, pH=9,7, contendo 0,5M de NaCl. O gel úmido foi transferido, imediatamente, para bequer contendo 17,5 mg de proteínas (AgS *T. gondii* - item 3.10.1), dissolvido em tampão carbonato 0,1M, pH=9,7, contendo 0,5M de NaCl. O material foi mantido sob agitação contínua, por 2 h, à temperatura ambiente e em seguida, 20 h a 4°C. O gel foi, então, transferido para coluna de vidro (4 x 8 cm) com placa porosa e lavado exaustivamente com SST 0,15M, pH=7,2. Após a lavagem, o fluxo da coluna foi fechado e a coluna mantida a 4°C até o uso.

3.14. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Anticorpos IgG anti-*T. gondii* humanos ou de coelhos (item 3.12) foram separados por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-4B acoplados com AgS *T. gondii* (item 3.13) de acordo com GARVEY et alii (1977). Resumidamente, com o fluxo da coluna fechado e com SST 0,15M pH=7,2 cobrindo superficialmente o gel, foram adicionados à coluna 5 ml de SST 0,15M pH 7,2 contendo 4 mg/ml de IgG humana ou de coelho purificada (item 3.12). A coluna foi mantida à temperatura ambiente, por 20 minutos, com agitação ocasional do gel, com o auxílio de uma espátula de

vidro. O fluxo da coluna foi, então, normalizado e a coluna lavada exaustivamente com SST 0,15M, pH=7,2, até que a densidade óptica do efluente, a 280 nm, fosse igual a zero. . O fluxo foi novamente interrompido e adicionou-se 5 ml de glicina-HCl 0,2M, pH=2,3 ao gel. Após 15 minutos, o fluxo da coluna foi normalizado, a amostra contendo IgG humana ou de coelho anti-*T. gondii* coletada, ao mesmo tempo em que foram adicionados mais 10 ml de glicina-HCl, seguidos de 35 ml de tampão borato 0,2M, pH=8,4. Deste modo, o volume final da solução contendo IgG humana ou de coelho anti-*T. gondii* foi de, aproximadamente, 50 ml. Esta amostra final foi concentrada por ultrafiltração a vácuo, usando membrana capaz de reter moléculas com pesos moleculares maiores do que 10.000 daltons (filtros imersíveis CX 10, Millipore Corp. Massachusetts, USA), até atingir o volume inicial de 5 ml. A concentração de proteínas foi determinada e as amostras mantidas a -4°C, até o uso.

3.15. ELISA PARA CAPTURA DE ANTÍGENOS (ELISAc).

As reações de ELISAc foram realizadas de acordo com HASSL & ASPÖCK (1990), com algumas modificações, como segue:

Para sensibilizar as placas de microtitulação (Greiner Labortechnik) foram adicionados a cada orifício 100 µl de uma solução de IgG humana anti-*T. gondii* contendo 5 mg de proteína/ml em tampão carbonato 0,1M, pH=9,6 (item 3.14). As placas foram, então, mantidas durante 1 hora, à temperatura ambiente e 18 h, à 4°C. Após a remoção do material não acoplado à placa, os sítios livres, foram bloqueados com soro albumina bovina (SAB) a 1% em SST 0,11M, pH=7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (SST/Tw20/SAB). As placas foram incubadas com esta solução, a 4°C, por 6 horas. Os orifícios das placas foram, então, lavados, 3 vezes, com 150 µl de SST 0,11M, pH=7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (SST/Tw20). A seguir, 100 µl das amostras de urina ou plasma, diluídas a 1/10 em SST/Tw20/SAB, foram adicionados aos orifícios das placas. As placas foram, então, incubadas por 18 h, a 4°C, e posteriormente seus orifícios lavados como descrito. Foram, então, adicionados aos orifícios da placa, 100 µl de uma solução de IgG de coelho anti-*T. gondii* contendo uma concentração de proteínas de 2,5 mg/ml diluída em SST/Tw20 (item 3.14). Após 2 h de incubação, a 37°C, os orifícios das placas foram lavados, como descrito, e aos mesmos foram acrescentados 100 µl de conjugado (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase - (Sigma Chemical Corp.,

St. Louis, USA), diluído a 1:8000 em SST/Tw20. Após 1 h, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas como descrito. Adicionou-se, então, a cada orifício da placa, 100 µl de uma solução contendo 0,4 mg/ml de ortofenilenodiamina (OPD- Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA), diluído em tampão citrato 10 mM, pH=4,5 contendo 0,004% de H₂O₂. Após incubação por 20 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, adicionou-se 25 µl de H₂SO₄ 2N a cada orifício da placa. A leitura das densidades ópticas foi realizada a 490 nm em uma leitora de placas de ELISA (Ety System Reader, Sorin Biomédica, Itália).

Todas as amostras foram testadas em triplicata. Todas as placas continham controles de antígeno, conjugado, substrato e tampão, além dos controles positivos e negativos. Foram também incluídos em cada placa, padrões com concentrações conhecidas de proteínas (AgS *T. gondii*). A média das absorbâncias de cada amostra foi convertida em µg de proteína/ml usando a curva padrão resultante do ensaio dos padrões com concentrações conhecidas de proteínas.

3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Foi feita análise da variância dos dados experimentais utilizando o pacote estatístico Statgraf versão 6.2.

Os resultados da análise estatística, foram expressos em intervalo de confiança para média (SNEDECOR & COCHRAN, 1980).

3.17. MATERIAIS.

Acetato de sódio, ácido sulfúrico, ácido bórico, azida sódica, azul de Evans, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de sódio, fosfato dibásico de sódio, fosfato monobásico de sódio, glicerina, glicina,, glicina ácido clorídrico, hidróxido de sódio, reagente de Folinciocalteau, sulfato de amônio, tetraborato de sódio, uréia, E. Merck Darmstadt, Alemanha.

Placas de microtitulação de poliestireno, Greiner, Alemanha.

Adjuvante completo de Freund, água oxigenada 30 volumes, brometo de cianogênio, DEAE celulose, IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase, ortofenilenodiamina, Sigma Chemical Corp. St. Louis, USA.

Acetonitrila, Carlo Erba, Itália.

Filtros imersíveis CX10, Millipore Corp. Massachusetts, USA.

Soro albumina bovina, Serva, Alemanha.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção de antígenos de *T. gondii*.

Para a detecção de antígenos de *T. gondii* na urina e plasma de camundongos infectados com o parasito foi utilizada a técnica de ELISA de captura (ELISAc). Na técnica, IgG humana anti-*T. gondii*, obtida por cromatografia de afinidade, foi utilizada para o revestimento dos orifício da placa de ELISA com o intuito de capturar antígenos nos materiais testados. Nas reações positivas, os antígenos de *T. gondii* foram reconhecidos por IgG de coelho anti-*T. gondii* obtida também por cromatografia de afinidade. Utilizou-se o conjugado IgG de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase e como substrato a ortofenilenodiamina.

Em cada placa de reação foram incluídos padrões contendo concentrações conhecidas de proteínas (AgS *T. gondii*). Todos os ensaios foram testados em triplicata e a média das absorbâncias foi considerada. A curva padrão obtida pela análise dos padrões, foi utilizada para transformar as absorbâncias obtidas em concentração de proteínas, expressas em µg/ml.

Em todas as reações realizadas nas amostras de plasma e urina, a técnica evidenciou alta reprodutibilidade, com limite inferior de sensibilidade de 0,05 µg/ml.

4.2. LINHAGEM N DE *T. gondii*.

4.2.1. Mortalidade dos animais

Todos os camundongos inoculados com taquizoitos da linhagem N de *T. gondii* (1000, 25000, 50000 e 100000 parasitos) morreram durante a fase aguda da infecção até 10 DAI. Os animais inoculados com 1000 taquizoitos, morreram entre 7 e 10 DAI, enquanto que os que receberam dose maior morreram entre 6 e 7 DAI. Metade dos animais inoculados com 100000 taquizoitos morreu entre 5 e 6 DAI (Fig. 1).

4.2.2. Concentrações de antígenos na urina.

A concentração de antígenos na urina dos animais no 6º dia após a inoculação de 25000, 50000 e 100000 taquizoitos foi 194,5 vezes maior do que aquela observada na urina dos animais inoculados com 1000 taquizoitos no 8º dia após a inoculação (Tabela 1).

4.3. LINHAGEM P DE *T. gondii*.

4.3.1. Mortalidade dos animais.

A Fig. 2 mostra a mortalidade dos animais inoculados com 1, 6 ou 12 cistos da linhagem P de moderada virulência de *T. gondii*. O tempo de sobrevivência dos animais infectados com um único cisto foi maior do que aquele observado para os animais inoculados com 6 ou 12 cistos.

4.3.2. - Concentrações de antígenos na urina e plasma

Os antígenos foram evidenciados no plasma, antes de serem detectados na urina. Antígenos de *T. gondii* foram detectados na urina de todos grupos de animais infectados com cistos da linhagem P. Na fig. 3A,B,C, observa-se que existem picos de eliminação relativamente sincrônicos entre os animais inoculados com diferentes inóculos, aos 6, 18, 30 e 60 DAI. Padrão similar de eliminação pode ser observado para os animais sangrados inoculados com 1 cisto (Fig. 4A). Os animais sangrados inoculados com 6 ou 12 cistos não foram acompanhados além de 32 e 20 DAI, respectivamente. Todos os animais inoculados com 12 cistos morreram até 20 DAI. Um dos animais inoculados com 6 cistos sobreviveu à fase

aguda da infecção, mas suas amostras de urina e plasma obtidas a partir de 32 DAI, foram insuficientes para submeter à técnica de ELISA, embora tenha sido suficiente para a reação de IFI para pesquisa de anticorpos.

As concentrações mais elevadas de antígenos na urina e plasma ocorreram em animais inoculados com 6 ou 12 cistos (Figs 3A,B,C e 4A,B,C), embora para todos os grupos de animais, as maiores concentrações tenham sido registradas entre 2 e 32 dias, período que coincide com aquele em que há ascendência de anticorpos. No plasma o pico de maior concentração de antígenos foi observado em torno de 18 DAI (Fig. 4A,B,C), independente do inóculo. Também foi detectada atingenemia na fase crônica (Fig. 4A).

4.3.3 Peso dos animais

Os animais infectados apresentaram uma curva de peso muito diferente dos animais normais (Fig. 5). Enquanto estes ganharam peso continuamente, os infectados começaram a perder peso entre 10 e 12 DAI, apresentando uma curva descendente até 22 DAI. Após este período, houve uma gradativa recuperação do peso. O período onde ocorreu acentuada

perda de peso, coincide com a fase de maior mortalidade dos camundongos (Fig. 2A,B).

4.3.4. Títulos de anticorpos

A Fig. 6 mostra os níveis de anticorpos circulantes, obtidos pela reação de IFI, nos animais inoculados com diferentes números de cistos de *T. gondii*. Para melhor visualização dos resultados os dados foram expressos em log da recíproca dos títulos de anticorpos obtidos. Os animais inoculados com 12 cistos morreram até 19 DAI, o que permitiu o acompanhamento da cinética dos anticorpos apenas neste período. Nos animais inoculados os títulos de anticorpos foram detectados a partir de 8 DAI, exceto no grupo de animais inoculados com 1 cisto, cujos anticorpos só foram detectados a partir de 10 DAI. Como pode ser observado, houve um contínuo aumento dos títulos de anticorpos circulantes até o 36 DAI, período no qual os títulos de IFI atingiram valores de 1/64000 e se estabilizaram no período subsequente, com ligeiras oscilações. A Fig. 7A,B,C mostra os títulos de anticorpos dos animais inoculados com 1, 6 ou 12 cistos frente às respectivas concentrações de antígenos observadas no plasma e urina. Nesta figura pode-se observar que as maiores concentrações de antígeno no plasma

ocorreram no período em que os títulos de anticorpos estavam em elevação, independente do número de cistos inoculados. A maior concentração de antígenos no plasma ocorreu em torno de 18 dias após a infecção.

4.3.5. - Número de cistos no cérebro

Todos os valores apresentados quanto ao número de cistos no cérebro foram expressos considerando apenas o volume da aliquota examinada. O número de cistos de *T. gondii* no cérebro por animal infectado não depende do número de cistos inoculados (Fig 8, $p=0,7955$), mas está relacionado com o tempo de infecção dos animais (Fig 9, $p=0,0058$). Em geral os animais que morrem entre 10 e 19 DAI (valores destacados em círculo na Fig 9) apresentam pequeno (até 8) número de cistos no cérebro, enquanto animais que morreram entre 20 e 42 DAI o número de cistos presentes no cérebro foi maior (entre 12 e 35 cistos). Nos animais que foram sacrificados aos 103 DAI, esta média foi maior que a dos animais que morreram até 20 DAI. Aqueles que morreram entre 20 e 41 DAI revelaram perfil diferente dos demais. É interessante destacar que entre os animais que foram sacrificados aos 103 DAI, há os que apresentam número de cistos compatíveis com os dois grupos anteriormente mencionados.

4.3.6. Volume de cistos no cérebro

A Fig. 10 apresenta a distribuição de frequência do volume dos cistos (expresso em μm^3) de todos os animais examinados (Fig 10A), dos que morreram durante a fase aguda da infecção (Fig 10B) e dos que foram sacrificados no final do experimento (Fig 10C). Esta figura mostra que há predomínio de cistos pequenos no cérebro, independente do período em que foram observados. O volume médio dos cistos por animal, não está relacionado com número de cistos inoculados (Fig. 11 , $p=0,7428$), mas com tempo de infecção (Fig. 12 $p=0,0058$), sendo que o volume médio dos cistos aumenta no decorrer da infecção.

A Fig. 13A,B,C ilustra a dispersão dos volumes dos cistos de *T. gondii* (expresso em μm^3) por animal, expresso pelo dia do óbito nos animais infectados com 1, 6 ou 12 cistos da linhagem P de *T. gondii*.

A detecção mais precoce de cistos no cérebro ocorreu 11 dias após a infecção (Fig. 13B), quando o título de anticorpos circulantes era de 1:128 (Fig. 6) e já se constatava antigenúria e antigenemia (Fig. 3 e 4).

O menor cisto foi observado 16 DAI com volume de $480 \mu\text{m}^3$, enquanto que o maior, detectado aos 103 DAI, apresentou volume de

1129612,83 μm^3 , 2355 vezes maior (Fig. 13B). É interessante constatar a presença simultânea de cistos grandes e pequenos no mesmo tempo de infecção (Fig. 13A,B,C).

4.3.7. Tabela e Figuras

TABELA 1- Concentração de antígenos ($\mu\text{g/ml}$) de *T. gondii* na urina de camundongos experimentalmente infectados com diferentes quantidades de taquizoitos da linhagem N, em diferentes períodos após a infecção.

Nº de taquizoitos	Concentração ($\mu\text{g/ml}$) de antígenos de <i>T. gondii</i> na urina			
	DAI 2	DAI 4	DAI 6	DAI 8
1000	ND	ND	ND	0,08
25000	ND	ND	14,86	^a
50000	ND	1,22	21,08	^a
100000	ND	4,05	10,74	^a

^a - Não houve sobrevivente.
ND - Não detectável.

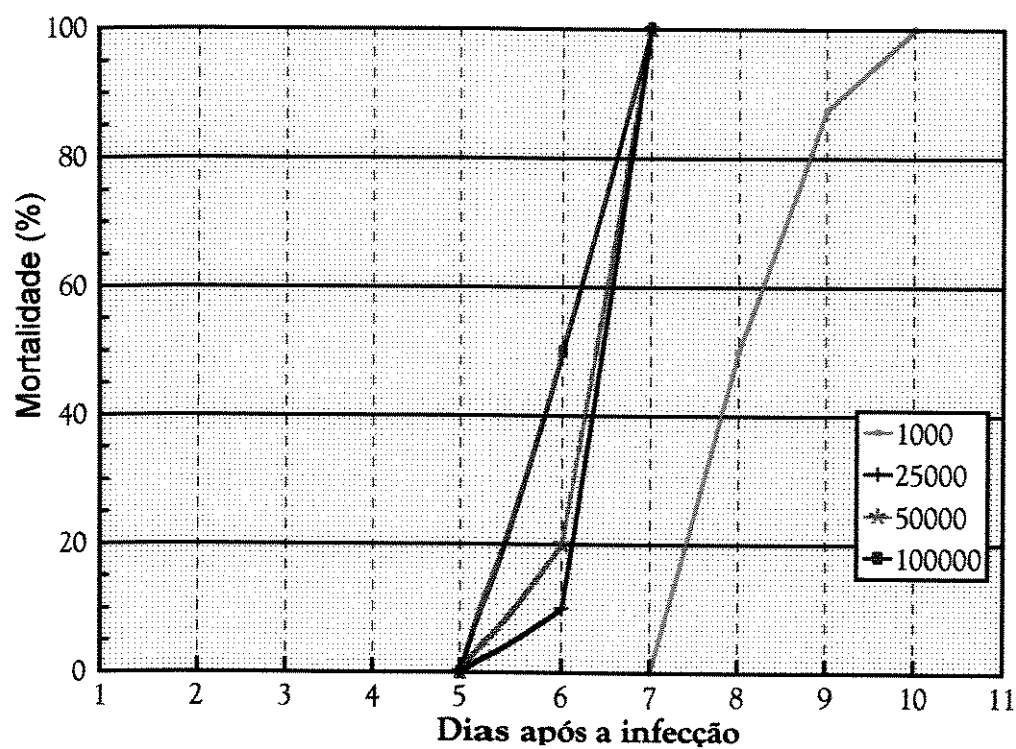


Figura 1 - Mortalidade de camundongos inoculados com 1000, 25000, 50000 e 100000 taquizoitos da linhagem N de *T. gondii*.

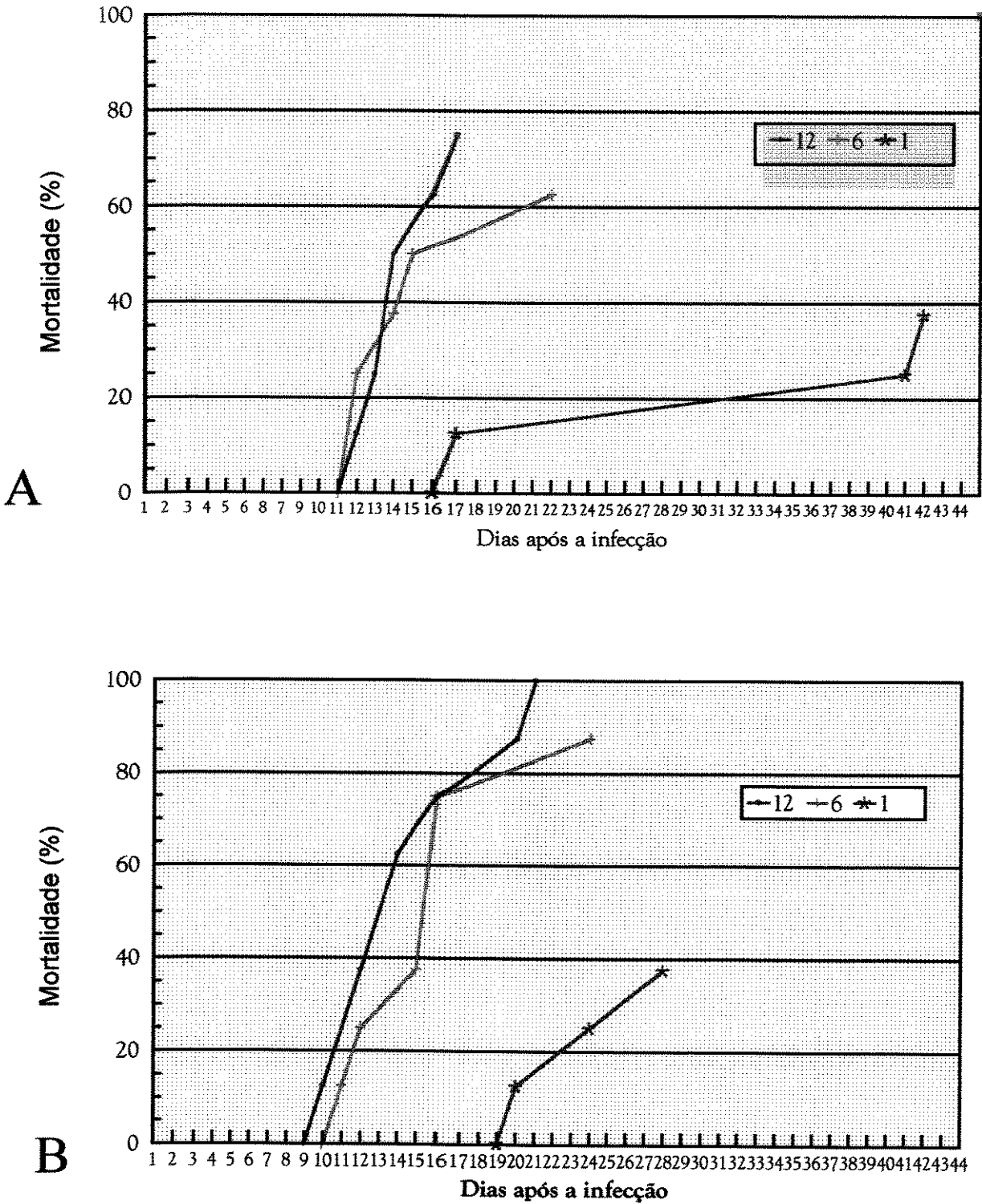


Figura 2 - - Mortalidade de camundongos inoculados com 1, 6 ou 12 cistos da linhagem P de *T. gondii*. A) Animais não sangrados (ANS). B) Animais Sangrados (AS).

1

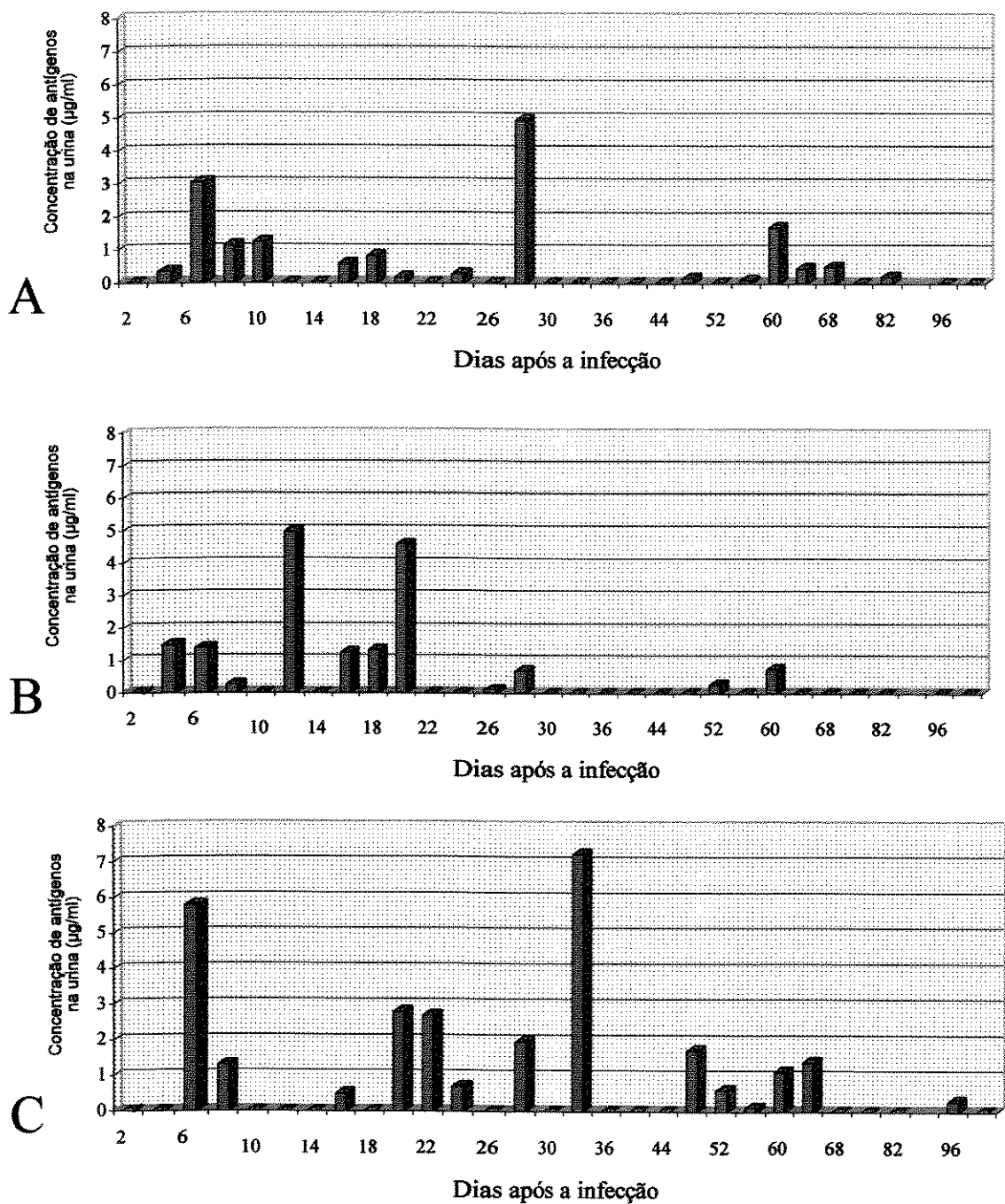


Figura 3 -Concentração de antígenos (µg/ml) na urina de animais não sangrados inoculados com cistos da linhagem P de *T. gondii*, em diferentes períodos após a infecção. A) Animais inoculados com 1 cisto. B) Animais inoculados com 6 cistos. C) Animais inoculados com 12 cistos.

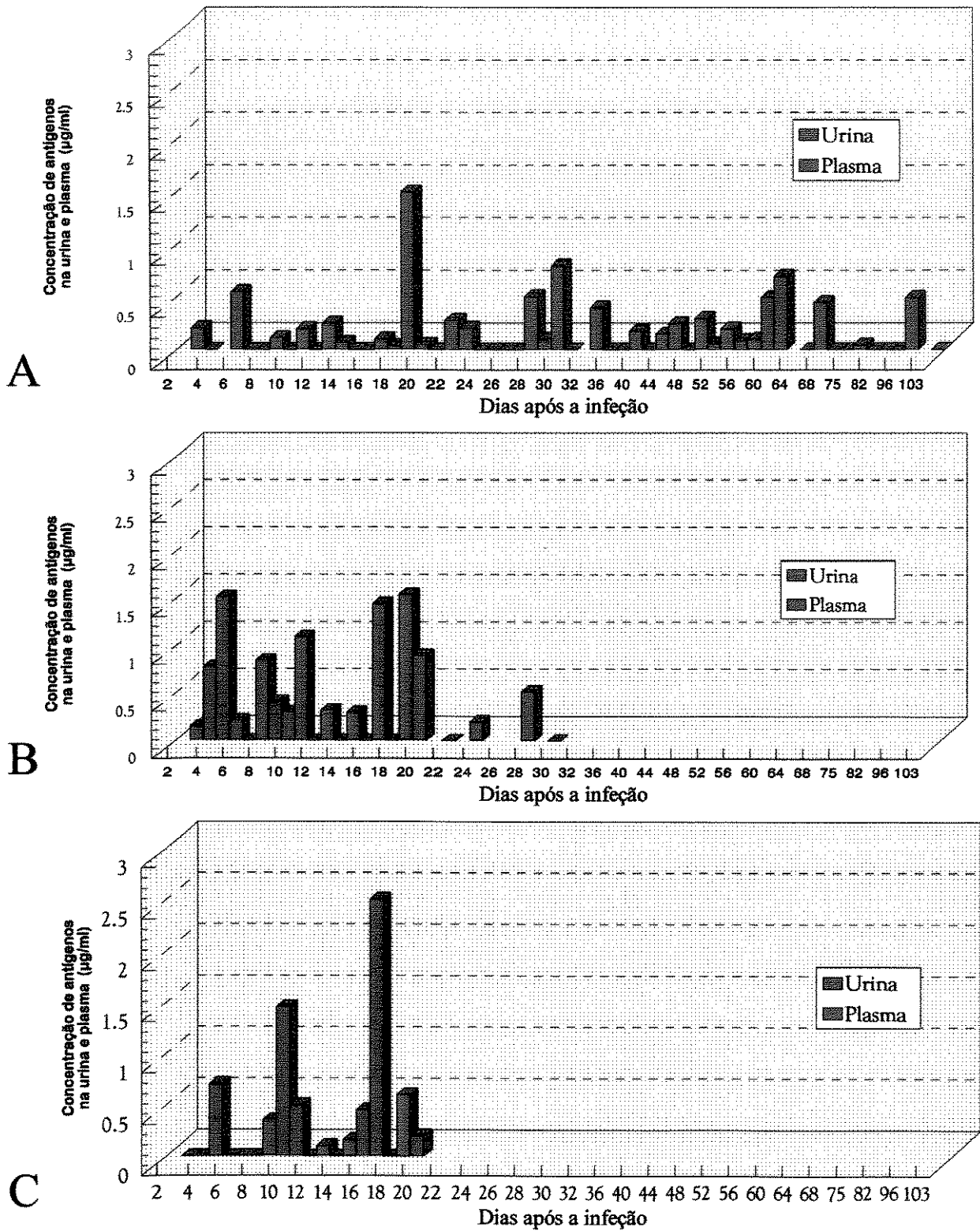


Figura 4 -Concentração de antígenos (µg/ml) na urina de animais sangrados inoculados com cistos da linhagem P de *T. gondii*, em diferentes períodos após a infecção. (A) Animais inoculados com 1 cisto. B) Animais inoculados com 6 cistos. C) Animais inoculados com 12 cistos.

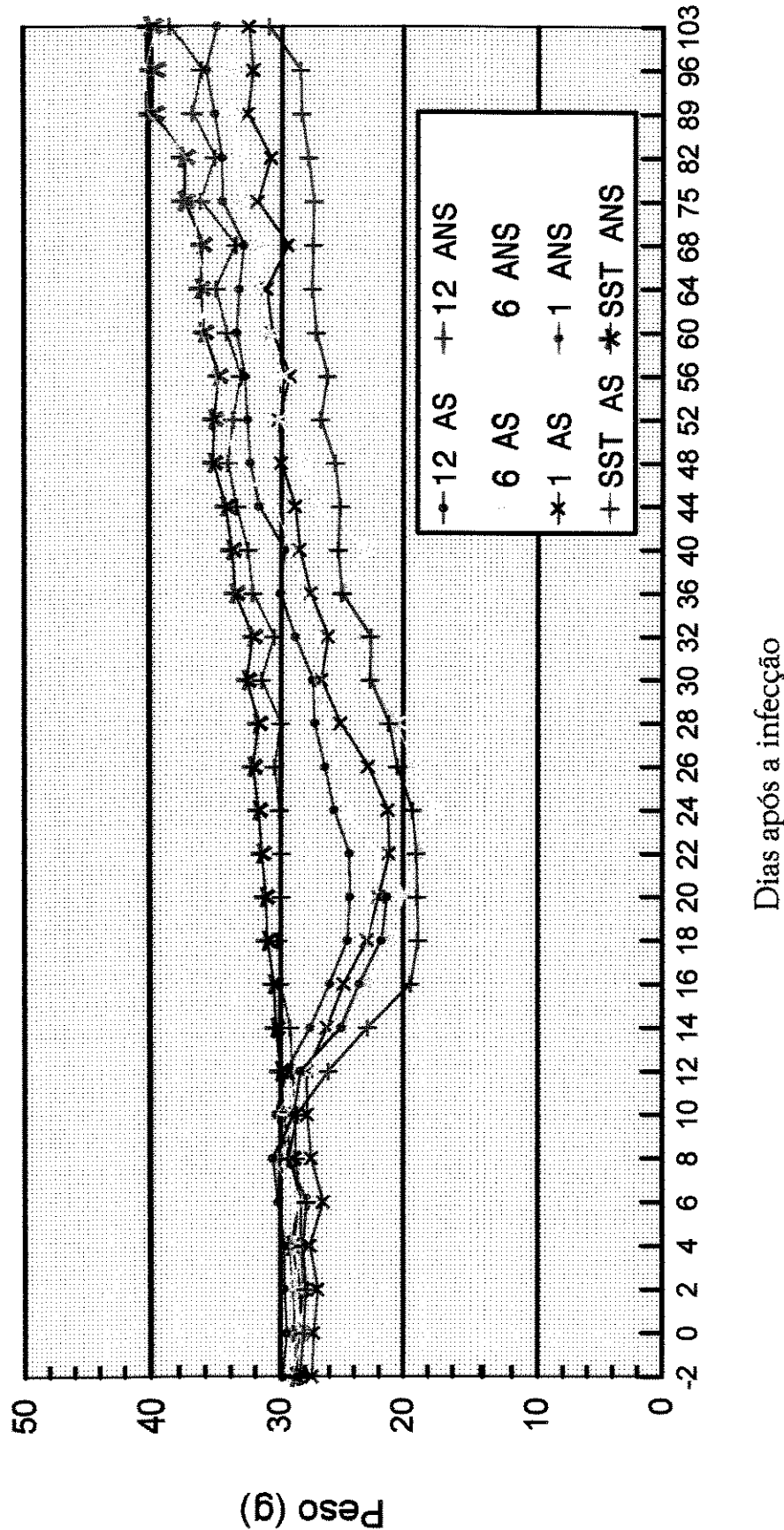


Figura 5 - Curva de peso médio (g) de animais inoculados com solução salina tamponada (SST), 1, 6 ou 12 cistos da linhagem P de *T. gondii* em animais sangrados (A S) e não sangrados (ANS), por diferentes períodos após a infecção. SST = Solução salina tamponada 0,01M, pH=7,2.

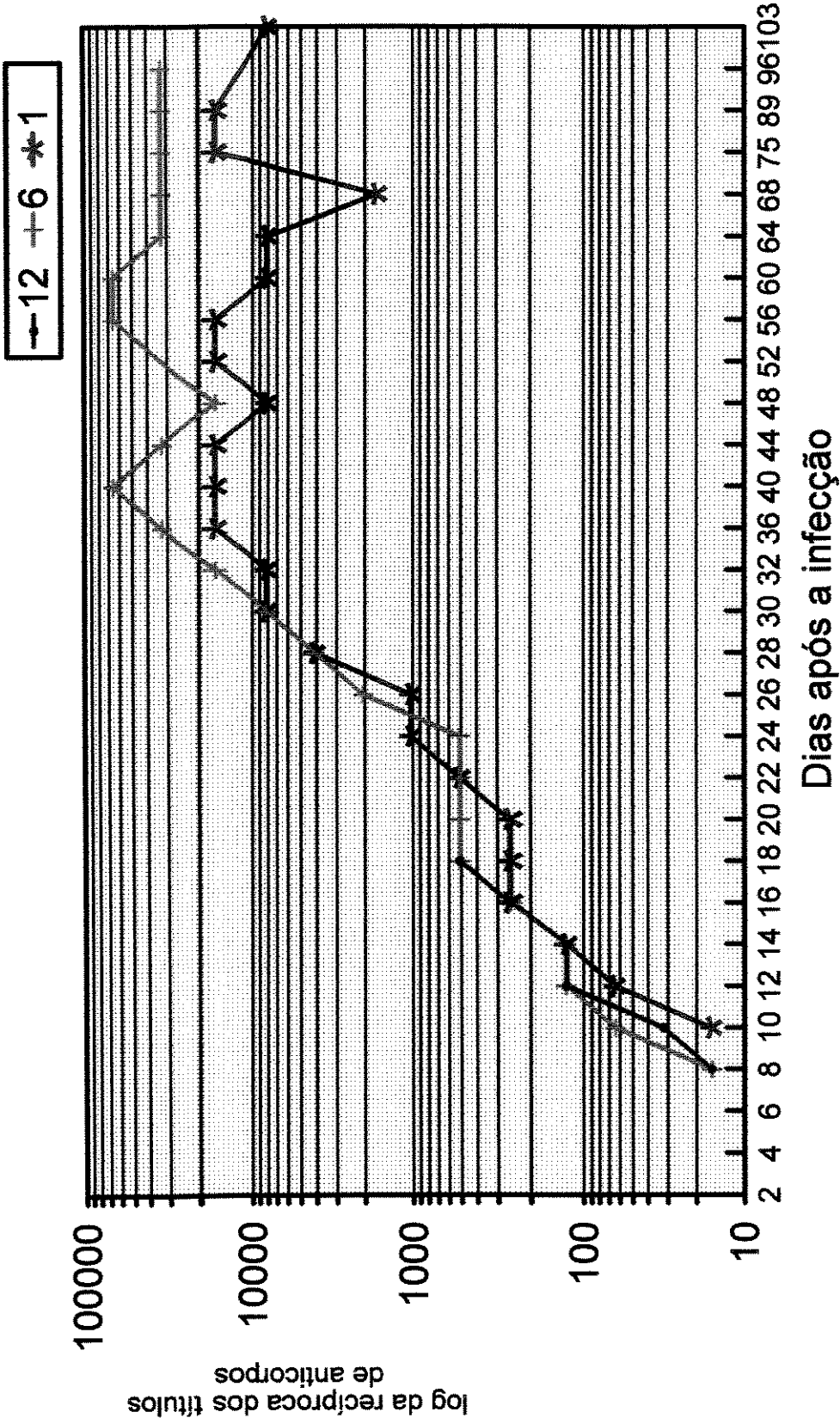


Figura 6- Níveis de anticorpos detectados por reação de imunofluorescência indireta em camundongos inoculados com 1, 6 ou 12 cistos da linhagem P de *T. gondii*, em diferentes períodos após a infecção.

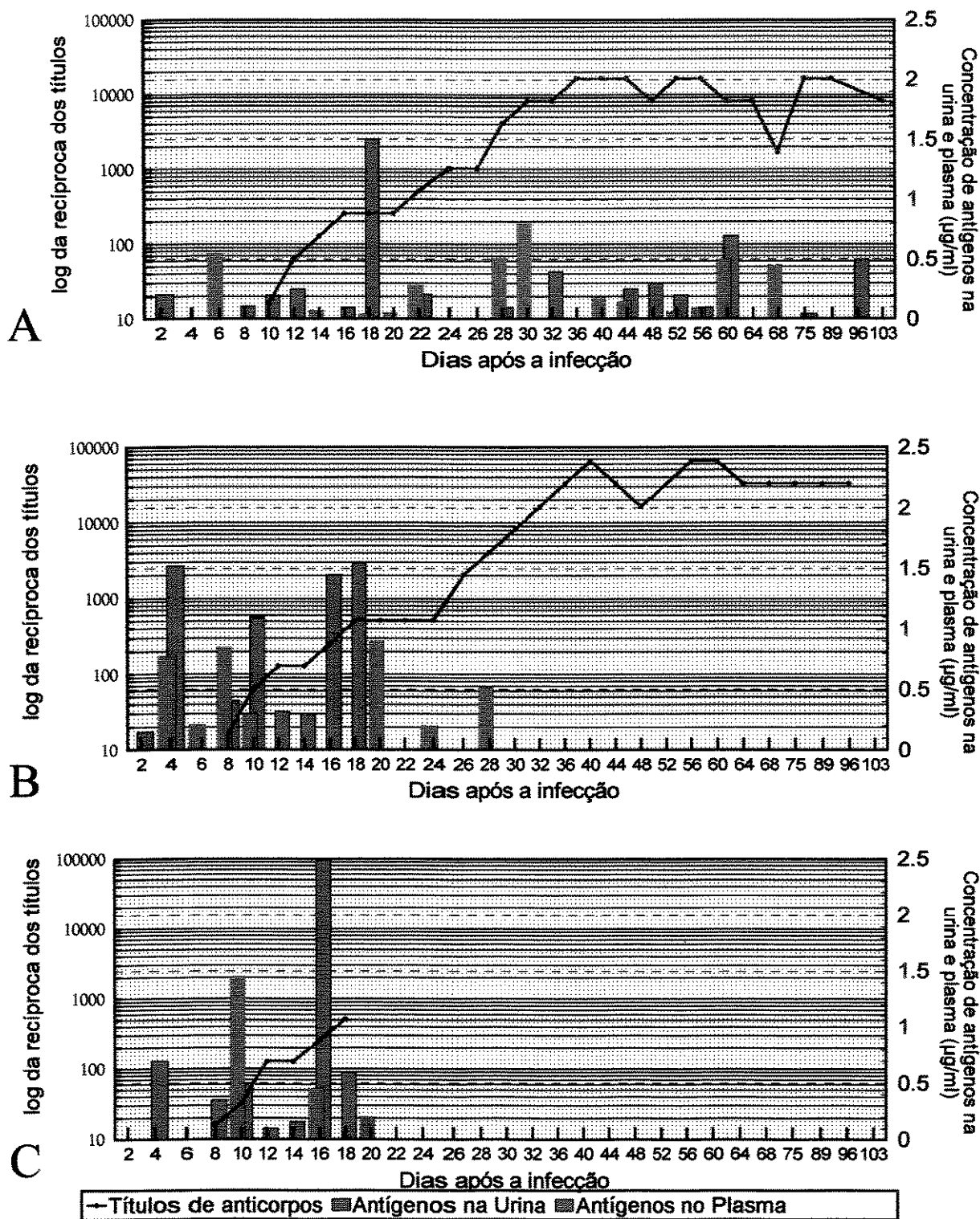


Figura 7- - Concentração de antígenos na urina e plasma (µg/ml) e nível de anticorpos por IFI (log da recíproca dos títulos) de animais inoculados com cistos da linhagem P de *T. gondii*, em diferentes períodos após a infecção. (A) Animais inoculados com 1 cisto. B) Animais inoculados com 6 cistos. C) Animais inoculados com 12 cistos .

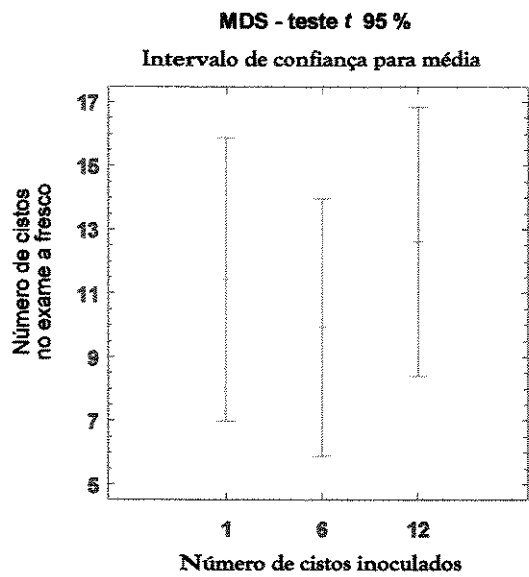


Figura 8- Intervalo de confiança da média para número de cistos no exame a fresco de cérebro de camundongos inoculados com 1, 6 ou 12 cistos de linhagem P de *T. gondii*.($p = 0,7955$). MSD=Mínima diferença significativa

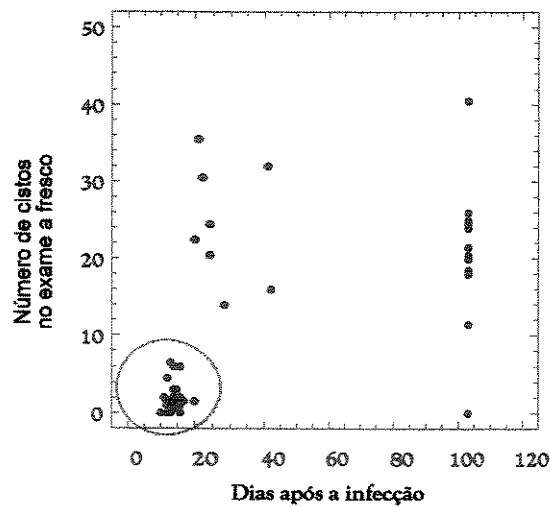


Figura 9 - Dispersão do número de cistos no exame a fresco de cérebro de camundongos inoculados com 1, 6 ou 12 cistos da linhagem P de *T. gondii*, em diferentes intervalos de tempo após a infecção. Valores no círculos são significativamente diferentes dos demais ($p=0,0058$).

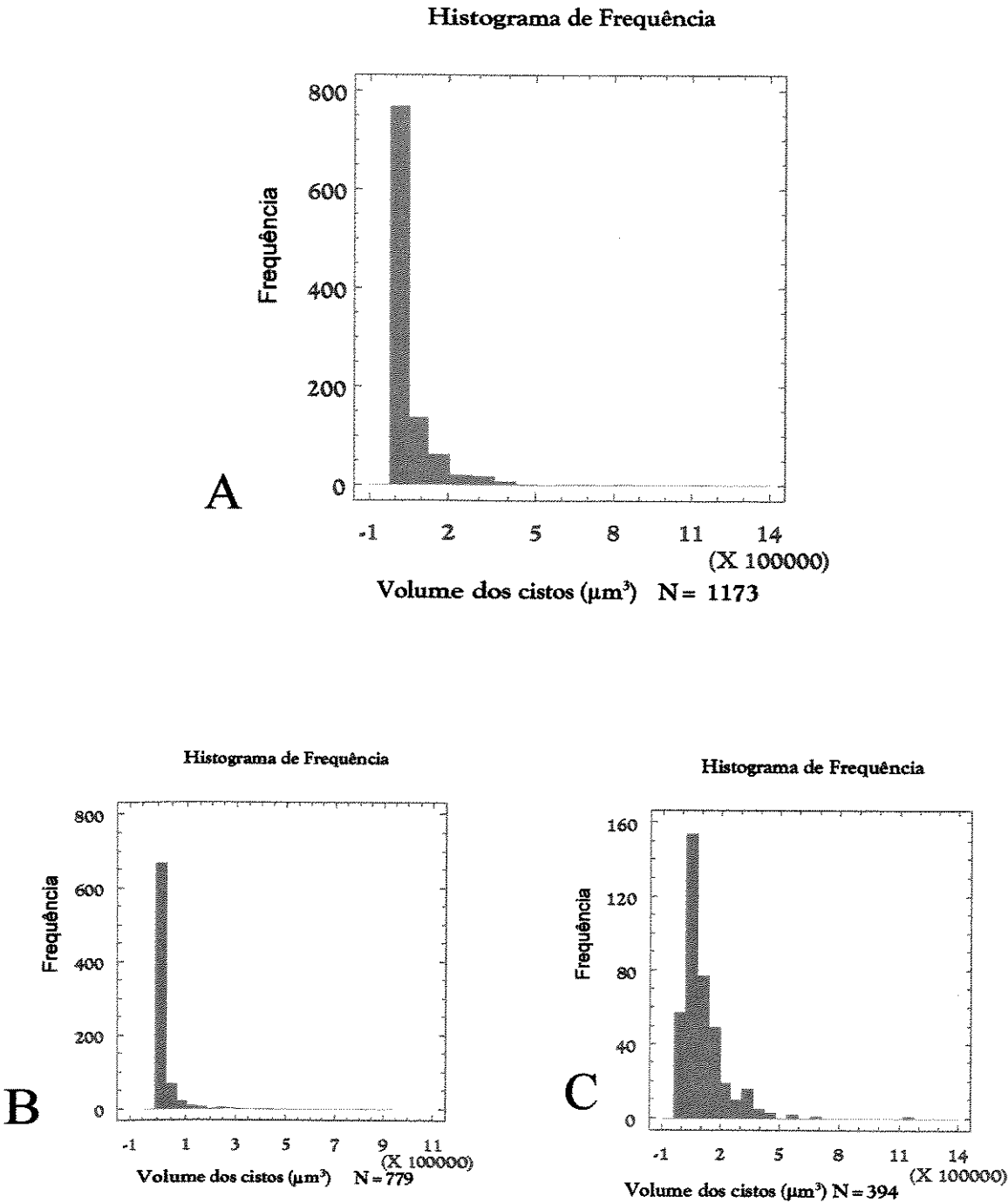


Figura 10 - Histograma de frequência do volume dos cistos. A) Volume de todos os animais. B) Volume dos cistos dos animais que morreram durante a fase aguda da infecção. C) Volume dos cistos dos animais que foram sacrificados com 103 dias de infecção.

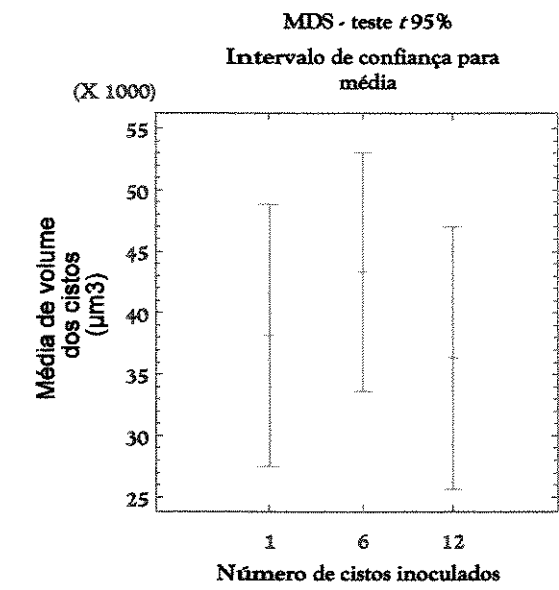


Figura 11 - Intervalo de confiança para média de volume de cistos de cérebro de camundongos inoculados com 1, 6 ou 12 cistos de linhagem P de *T. gondii*. ($p = 0,7428$). MDS= Mínima diferença significativa

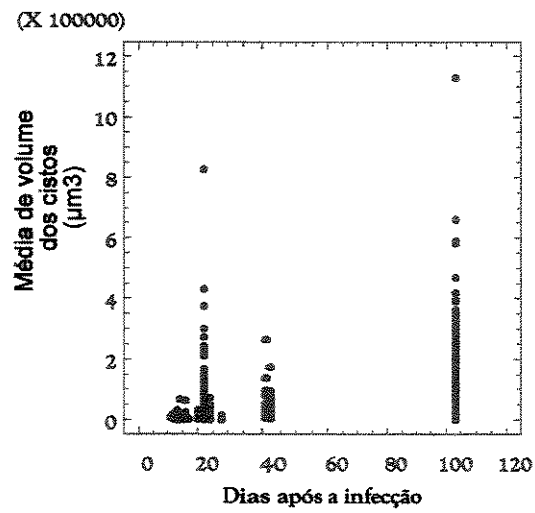


Figura 12 -Dispersão de volume dos cistos no cérebro de camundongos inoculados com 1, 6 ou 12 cistos de linhagem P de *T. gondii*, em diferentes períodos após a infecção ($p = 0,0058$).

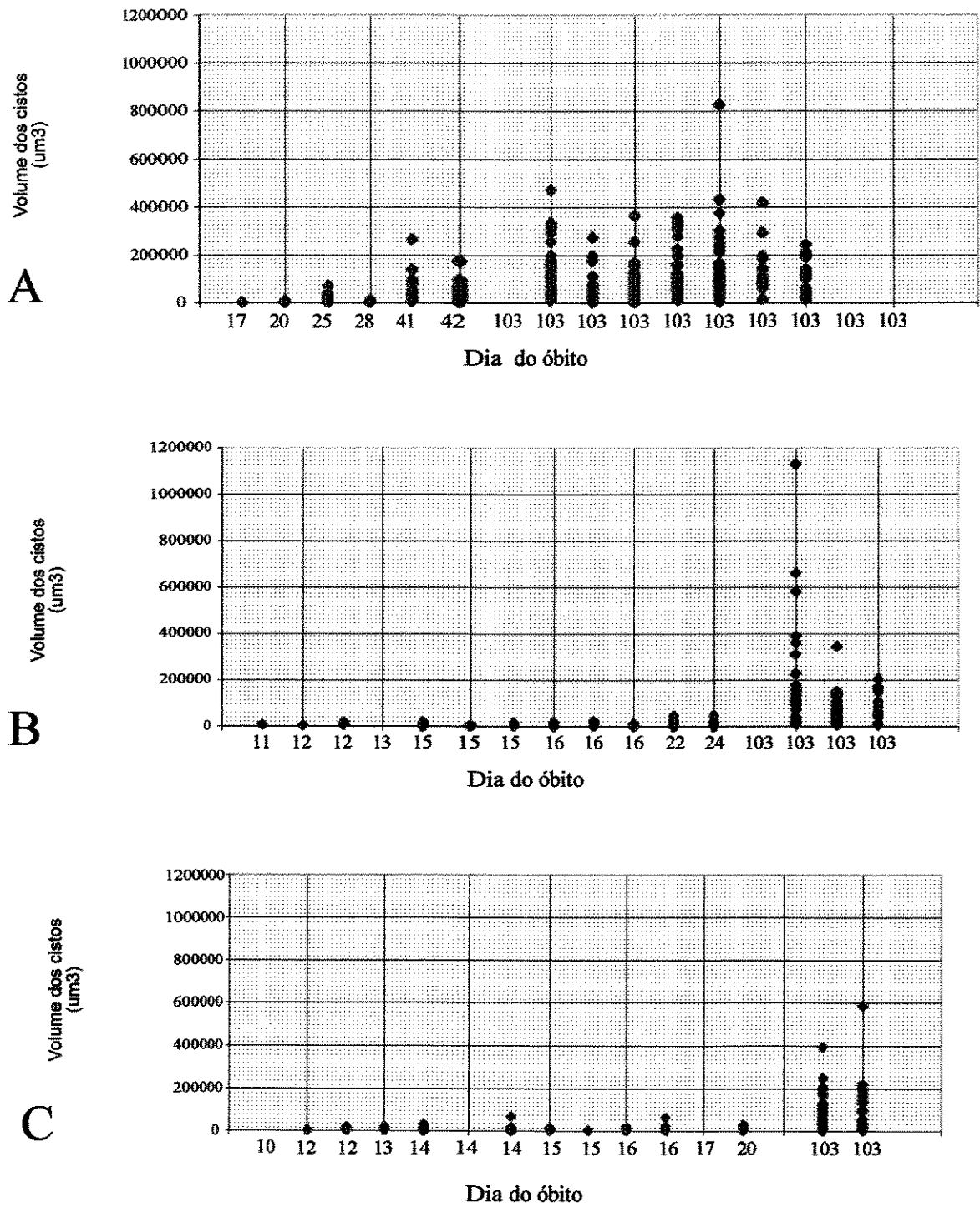


Figura 13- Dispersão do volume dos cistos por dia de óbito em animais inoculados com cistos da linhagem P de *T. gondii*. A) Animais inoculados com 1 cisto. B) Animais inoculados com 6 cistos. C) Animais inoculados com 12 cistos.

5. DISCUSSÃO

Esta é a primeira vez que se demonstra a ocorrência de antígenos de *T. gondii* na urina e plasma de camundongos na fase crônica da infecção. Os relatos anteriores demonstraram a antigenúria em camundongos durante a fase aguda com linhagem de alta virulência do parasito (HUSKINSON *et alii*, 1989; FACHADO *et alii*, 1990).

A técnica de ELISA para captura de antígenos, apresentou boa sensibilidade, já que foi possível detectar níveis de proteína na concentração de 0,05 µg/ml, ao contrário do que foi obtido por FACHADO *et alii* (1990), cujo método de coaglutinação apresentou sensibilidade de 0,118 µg de proteínas/ml. A reprodutibilidade foi satisfatória, uma vez que os padrões com diferentes concentrações de proteínas, incluídos em todas as placas, apresentaram curva semelhante.

Foi possível detectar antígenos na urina de camundongos sem necessidade de concentrar as amostras, recurso requerido para detectar antígeno de *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* na urina de pacientes, mesmo durante a fase aguda da infecção. (FREILIJ *et alii*, 1987, KATZIN *et alii*, 1991; UMEZAWA *et alii*, 1993).

As amostras de urina obtidas de camundongos infectados com a linhagem N (Tabela 1) expressaram maior concentração de antígenos do que aquelas obtidas no mesmo período de animais submetidos à linhagem P do parasito (Figuras 3 e 4). Dados semelhantes foram observados por ACEBES *et alii* (1994) que investigaram antígenos circulantes com a técnica de ELISA de captura em camundongos infectados com três linhagens de *T. gondii*. Destas linhagens, duas apresentavam perfil semelhante às estudadas por nós, uma de alta virulência e outra subaguda. A concentração de antígenos circulantes nos animais inoculados com a linhagem de alta virulência foi muito maior do que aquela observada nos animais submetidos à infecção com a linhagem subaguda.

As Figuras 3 e 4 ilustram a cinética de antigenúria e antigenemia. No decorrer da infecção persiste a eliminação de antígenos na fase crônica. Os antígenos de *T. gondii* foram detectados no plasma dos animais infectados antes de serem detectados na urina (Figura 4), independente do inóculo. Os antígenos foram observados na urina a partir de 4 DAI, concordante com HUSKINSON *et alii* (1989), enquanto FACHADO *et alii* (1990) observaram eliminação de antígenos a partir de 2 DAI.

Foram detectadas concentrações antigênicas maiores na fase aguda do que na fase crônica da infecção em camundongos inoculados com *T. gondii* (Figura 3). Estes dados sugerem que antígenos de taquizoitos são predominantemente reconhecidos pela ELISA de captura de antígenos. Entretanto não podemos descartar a possibilidade de reação com antígenos de bradizoitos uma vez que é descrita a existência de antígenos comuns entre bradizoitos e taquizoitos (CESBRON-DELAUW *et alii*, 1994).

As concentrações antigênicas detectadas na urina sofrem um decréscimo após a fase aguda (36 DAI). Foram observados picos de eliminação de antígenos na fase crônica da infecção (Figura 3A) indicando a possibilidade de reagudização. FREILIJ *et alii* (1987), estudando pacientes chagásicos, observaram associação entre eliminação de antígenos na urina e fase ativa ou infecção recente pelo *T. cruzi*. Entretanto, KATZIN *et alii* (1991), observaram que a antigenúria não está relacionada com a parasitemia. ROCHA (1988) demonstrou a ocorrência de formas do *T. gondii* na urina de camundongos durante a fase aguda de camundongos e durante a na fase aguda e crônica, em ratos imunocompetentes. Estes dados parecem indicar, que para *T. gondii*, a ocorrência de reagudização pode estar

associada com o aparecimento de antígenos na urina de animais imunocompetentes infectados.

Os anticorpos foram detectados no sangue dos animais infectados com cistos da linhagem P de *T. gondii*, a partir de 8 DAI. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por HANDMAN & REMINGTON (1980), que demonstraram anticorpos circulantes em camundongos infectados com linhagens avirulenta e de relativa virulência de *T. gondii*, a partir de 8 DAI, pela reação de IFI e Sabin-Feldman. Estes autores observaram títulos ascendentes de anticorpos até 35 ou 43 DAI, dependendo da linhagem e consideraram que os animais estavam na fase crônica da infecção a partir de 50 DAI, ocasião em que os títulos de anticorpos se estabilizaram. Em nossos experimentos, os títulos de anticorpos circulantes aumentaram até 36 DAI. O período compreendido entre 2 e 40 DAI foi considerado fase aguda da infecção e o período posterior, a partir de 40 DAI, fase crônica. Todos os animais morreram no período coincidente com a fase aguda da infecção, exceto dois animais inoculados com 1 cisto do grupo AS que morreram 41 e 42 DAI, no início da fase crônica. Esta mortalidade, considerada tardia, pode ter ocorrido em decorrência de uma reagudização, embora não tenham sido demonstrados antígenos na urina

destes animais aos 40 DAI. Porém, aos 44 DAI os animais deste grupo eliminaram antígeno na urina.

Para comprovar a hipótese de reagudização utilizando a técnica de ELISA para captura de antígenos, torna-se necessária a caracterização molecular dos antígenos eliminados na urina e sua respectiva comparação com os de taquizoitos e bradizoitos, já descritos. O antígeno denominado SAG1 (P30), proteína altamente imunogênica de taquizoitos tem despertado interesse como reagente para diagnóstico, componente de vacina e seu papel na invasão celular (MINEO & KASPER, 1994). Existe discriminação antigênica entre taquizoitos de linhagens virulentas e avirulentas. O uso de anticorpos monoclonais para antígeno de superfície P22, expresso em 25 linhagens de *T. gondii* (4 virulentas e 21 avirulentas), revelou que dois alelos estão envolvidos, um deles idêntico ao gene da linhagem virulenta RH (PARMLEY *et alii*, 1994a). Recentemente, foi descrito um antígeno abundante na matriz de cistos que não foi detectado em taquizoitos (PARMLEY *et alii*, 1994b).

O monitoramento de anticorpos circulantes pela reação de IFI concomitante à reação de antígenos na ELISA, buscou relacionar a cinética dos antígenos com a de anticorpos. Os resultados ilustrados na Figura 7

indicam que a diminuição dos níveis antigênicos no plasma está relacionado com a ascensão dos títulos de anticorpos.

O perfil de mortalidade apresentado pelos animais infectados com 10^5 taquizoitos da linhagem N (Figura 1), onde todos morreram entre 5 e 6 DAI, foi similar ao apresentado pelos camundongos infectados com o mesmo inóculo do parasito da linhagem RH (HUSKINSON *et alii*, 1989), com sobrevivência de 6 a 8 dias. Resultados compatíveis também foram descritos por DEROUIN & GARIN (1991). Estes dados parecem indicar que os mecanismos que levam à morte dos animais inoculados com linhagens de alta virulência devem ser semelhantes.

A imunidade protetora contra *T. gondii* é mediada pela resposta celular do hospedeiro. A sobrevivência de camundongos na fase aguda da toxoplasmose é atribuída à IL-12, citocina produzida por macrófagos e monócitos e que estimula a produção de interferon gama pelas células NK (GAZZINELLI *et alii*, 1994). O papel protetor de IL-12 foi evidenciado em dois experimentos. Camundongos imunodeficientes scid/scid infectados com *T. gondii*, quando tratados com anticorpo policlonal anti-IL12 expressaram mortalidade precoce na fase aguda (HUNTER *et alii*, 1994). Camundongos imunocompetentes (A/J) aumentam a sobrevida na fase aguda da

toxoplasmose se recebem injeção de IL-12 exógena até o 3º dia da infecção. Após este período, a IL-12 exógena perde a capacidade de controlar a infecção (KHAN *et alii*, 1994).

No decorrer da infecção com a linhagem P, houve perda de peso dos animais concomitante ao período de maior mortalidade (Figuras 3 e 5). Houve recuperação parcial de peso dos animais infectados, em contraposição com os achados de STAHL & TUREK (1988). Estes autores infectaram camundongos heterogênicos Nya com 8 cistos da linhagem CS, descrevendo uma síndrome degenerativa onde os animais evoluem com marcante perda de peso, sintomas neurológicos e morte. A diferença observada em nossos resultados pode estar associada à linhagem do parasito e do hospedeiro.

O encontro dos primeiros cistos aos 11 DAI é concordante com os achados de CONLEY & JENKINS (1981) e REMINGTON & CAVANAUGH (1965) que observaram o aparecimento dos primeiros cistos de *T. gondii* entre 6 e 12 dias após a infecção.

Quando se analisa a dispersão do número de cistos em função do tempo de infecção até 20 DAI, o número de cistos encontrados é baixo

(Figura 9 - valores no interior do círculo). Existe um outro padrão de comportamento que corresponde aos animais que morrem entre 20 e 42 DAI. A média do número de cistos em animais que foram sacrificados com 103 DAI foi similar aos valores obtidos nos animais que morreram entre 20 e 42 DAI. Entretanto, foi possível observar em alguns animais sacrificados no final do experimento valores compatíveis aos dos animais que morreram até 20 DAI. Estes dados indicam que deve haver uma assincronia no início do aparecimento de cistos no cérebro, sendo que alguns animais iniciam a produção de cistos no cérebro mais tardiamente. Outro fato que reforça esta hipótese é a constatação de que a maioria dos cistos presentes no cérebro destes animais apresentam pequeno volume (inferiores a $100000 \mu\text{m}^3$ - Fig. 13A).

Na população de camundongos submetida a vários inóculos de cistos da linhagem P de *T. gondii*, foi possível observar que mesmo aqueles indivíduos que evoluíram para a fase crônica, apresentam volumes de cistos similares aos encontrados na fase aguda (Figura 10). Foi possível constatar a predominância de cistos pequenos no cérebro 103 DAI (Fig. 10C e Fig. 13).

O encontro de cistos pequenos na fase crônica (Figura 14) sugere a ocorrência de neoformação. WONG & REMINGTON (1993) consideram a

possibilidade de bradizoitos escaparem de cistos sem romper completamente a parede dos cistos para gerarem cistos filhos em células adjacentes. CONLEY & JENKINS (1981), estudando cistos no cérebro de camundongos por reações imunohistoquímicas sugeriram a disseminação de taquizoitos, via hematogênica para explicar recrudescência da parasitemia. Da mesma forma HOFLIN & REMINGTON (1985) postulam que as lesões cerebrais de aidéticos resultam de reativação em órgãos periféricos com disseminação de taquizoitos via hematogênica para o sistema nervoso central. FRENKEL & ESCAJADILLO (1987), estudando nódulos microgliais em macacos, sugerem a ruptura de cistos como possível mecanismo para induzir a imunopatologia. Estes mecanismos poderiam também explicar a neoformação de cistos no cérebro de animais infectados com *T. gondii*.

A melhor forma de caracterizar inequivocamente a fase ativa da infecção pelo *T. gondii*, ainda está para ser determinada. Na tentativa de encontrar um método diagnóstico não invasivo, tem-se procurado indicadores de fase ativa da infecção na resposta imune do hospedeiro e na demonstração de DNA do parasito utilizando técnicas de biologia molecular ou na detecção de antígenos específicos através de técnicas imunológicas em fluidos corporais.

A IgA tem sido apontada como um eficiente indicador de fase aguda da infecção em casos de pacientes com linfadenopatia (TAKAHASHI & ROSSI, 1994), desaparecendo da circulação rapidamente (GROSS *et alii*, 1992). PINON *et alii* (1995), estudando casos de toxoplasmose ativa relacionada à síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), detectou a IgA em 38% dos casos, enquanto a IgM ajudou no diagnóstico apenas de 1 em 71 pacientes. Entretanto PATEL *et alii* (1993), relatam que enquanto pacientes aids com toxoplasmose primária sempre produzem IgM e IgA, não há diferença significativa na frequência de detecção de IgA entre pacientes aids com toxoplasmose crônica e aqueles que apresentam doença cerebral resultante de reativação da infecção.

EL-SAYED-KHALIFA *et alii* (1994), usando a reação de polimerase em cadeia para amplificação de DNA de *T. gondii*, demonstrou parasitemia em 55,5% a 77,8% em casos de toxoplasmose extracerebral, mas em apenas 13,3% dos pacientes com toxoplasmose cerebral, indicando a utilidade da técnica em casos em que há uma infecção disseminada pelo parasita. NOVATI *et alii* (1994) tiveram êxito na amplificação do DNA do parasita no fluido cérebro espinhal em 42,1% dos casos comprovados de encefalite toxoplásmica, observando melhores resultados quando o fluido era colhido e

examinado na primeira semana de terapia anti-*Toxoplasma*. A detecção de DNA do parasita apresenta limitações, uma vez que é difícil localizar regiões no genoma que representem as diferenças entre linhagens do *T. gondii* (RINDER *et alii*, 1995).

HAFID *et alii* (1995) compararam a técnica de ELISA de captura de antígenos com a técnica de “imunoblotting” para avaliar antigenemia em gestantes e aidéticos na fase aguda da infecção pelo *T. gondii*. O teste de “imunoblotting” detectou mais casos do que a de ELISA de captura e os casos de reativação só foram encontrados no grupo de aidéticos, onde existia antigenemia. Estes resultados demonstram a validade em detectar antígeno circulante para diagnóstico da toxoplasmose humana, principalmente em pacientes imunocomprometidos onde a resposta sorológica está prejudicada. FACHADO *et alii* (1994) demonstraram antígenos de *T. gondii* na urina em todos os pacientes aidéticos que apresentaram sintomas neurológicos devido à reativação de toxoplasmose crônica. Estes autores também sugerem que o monitoramento de antígenos de *T. gondii* na urina de pacientes aidéticos pode ser útil para orientar a terapia de modo a impedir o aparecimento da encefalite toxoplásmica porque os sintomas e antigenúria desaparecem com a terapia adequada.

Provavelmente será necessário utilizar mais de uma técnica para demonstrar a fase ativa do *T. gondii*, uma vez que nenhuma tem se mostrado capaz de caracterizá-la em todos os caso de toxoplasmose clínica.

Os nossos dados indicam que a detecção de antígenos no sangue e urina deve ser usada como alternativa de diagnóstico, uma vez que foi observado ocorrência intermitente de antígenos de *T. gondii* no sangue e urina de animais imunocompetentes.

Adicionalmente, a persistência de antigenúria e antigenemia (Fig. 4) no decorrer da infecção, associada à constatação de cistos pequenos na fase crônica (Fig. 13), sugere que ocorre reagudização da toxoplasmose em camundongos imunocompetentes.

6. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES.

1. Foi possível demonstrar a ocorrência de antígenos de *T. gondii* na urina e plasma, na fase aguda e crônica da infecção experimental em camundongos inoculados com a linhagem P de *T. gondii*, independente do número de cistos inoculados.
2. A técnica de ELISA para captura de antígenos foi desenvolvida para avaliar a concentração de antígenos de *T. gondii* na urina de camundongos experimentalmente infectados. Esta técnica mostrou alta reprodutibilidade e sensibilidade com limite inferior de 0,05 µg de proteínas/ml.
3. O número e volume médio dos cistos presentes no cérebro de camundongos experimentalmente infectados com a linhagem P de *T. gondii*, aumentam com o tempo de infecção e independe do número de cistos inoculados.
4. Na fase crônica da infecção com *T. gondii* em camundongos observa-se a ocorrência simultânea de cistos grandes e pequenos, indicando neoformação de cistos.
5. A análise de volume de cistos é um bom parâmetro para avaliar a neoformação, permitindo estudar o fenômeno da reativação da infecção pelo *T. gondii*.
6. A antigenúria e antigenemia persiste no decorrer da infecção, associada à neoformação de cistos indicando a ocorrência de reagudização durante a fase crônica da toxoplasmose em camundongos.

7. ANEXO

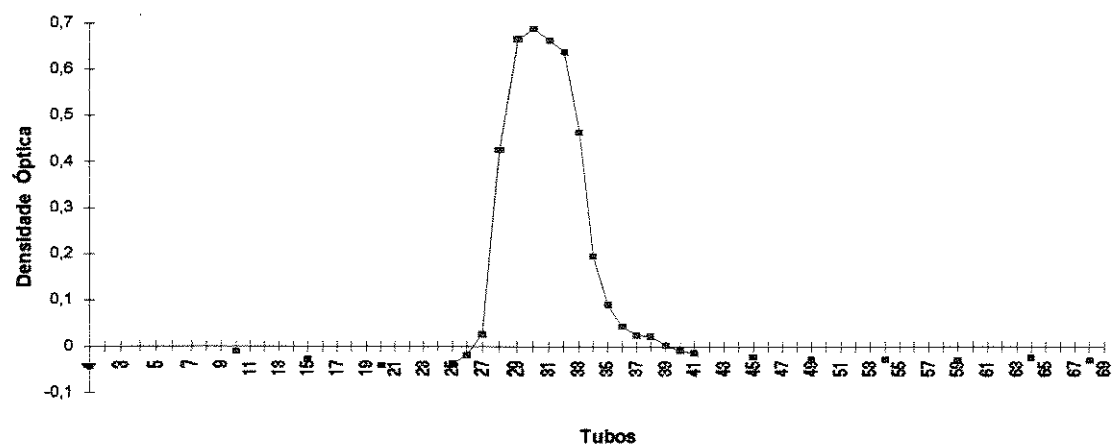


Figura 1. Densidade óptica a 280 nm das frações eluídas da cromatografia de soro humano anti-*Toxoplasma gondii* em coluna de DEAE-celulose. (Coluna de 1,9 x 32,4cm, 0.9ml/min, a 4°C, de 5,5 ml de soro, precipitado com sulfato de amônio e dialisado com tampão fosfato 0,0175M, pH=6,3).

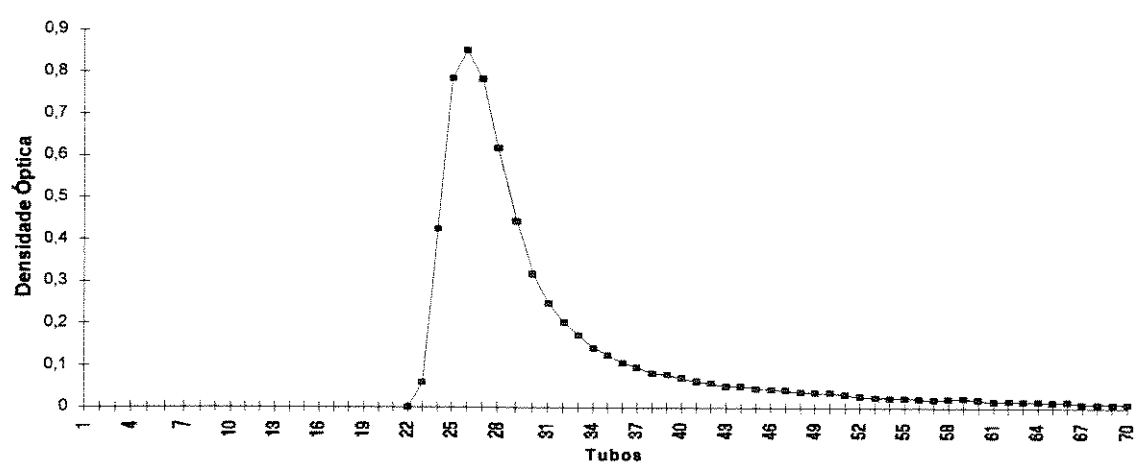


Figura 2. Densidade óptica a 280 nm das frações eluídas da cromatografia de soro de coelho anti-*Toxoplasma gondii* em coluna de DEAE-celulose. (Coluna de 1,9 x 32,4cm, 0.9ml/min, a 4°C, de 6,0ml de soro, precipitado com sulfato de amônio e dialisado com tampão fosfato 0,0175M, pH=6,3).

Anexo Estadístico					
Analysis of Variance for ANCIST.VIDA - Type III Sums of Squares					
Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:ANCIST.INOCUL	13166.828	2	6583.4140	5.322	.0092
B:ANCIST.SANGRIA	2938.331	1	2938.3308	2.376	.1315
RESIDUAL	47002.410	38	1236.9055		
TOTAL (CORRECTED)	63535.333	41			
1 missing values have been excluded.					
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

Table of Least Squares Means for ANCIST.VIDA

Level	Count	95% Confidence			
		Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	42	43.332135	5.4360664	32.324849	54.339421
A:ANCIST.INOCUL					
1	13	68.122515	9.7633314	48.353113	87.891918
6	14	35.701043	9.4317350	16.603078	54.799009
12	15	26.172846	9.0880476	7.770801	44.574892
B:ANCIST.SANGRIA					
S	21	34.924832	7.7019228	19.329498	50.520166
N	21	51.739438	7.7000358	36.147925	67.330951

Multiple range analysis for ANCIST.VIDA by ANCIST.INOCUL

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
12	15	26.172846	X
6	14	35.701043	X
1	13	68.122515	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 6	32.4215	27.5362 *
1 - 12	41.9497	26.9854 *
6 - 12	9.52820	26.5649

* denotes a statistically significant difference.
Multiple range analysis for ANCIST.VIDA by ANCIST.SANGRIA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
S	21	34.924832	X
N	21	51.739438	X

contrast	difference	+/- limits
S - N	-16.8146	22.0902

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for AGNSANG.AGUR - Type III Sums of Squares
Source of variation Sum of Squares d.f. Mean square F-ratio Sig. level

MAIN EFFECTS					
A:AGNSANG.DAI	17.307741	2	8.6538704	4.899	.0097
B:AGNSANG.GAIOLA	3.946826	2	1.9734131	1.117	.3320
RESIDUAL	146.60129	83	1.7662806		
TOTAL (CORRECTED)	168.00614	87			

6 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for AGNSANG.AGUR
95% Confidence

Level	Count	Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	88	.4988598	.1596924	.1811666	.8165530
A:AGNSANG.DAI					
2	47	1.1085531	.1939048	.7227975	1.4943088
4	27	.3307407	.2557690	-.1780881	.8395695
7	14	.0572854	.3554897	-.6499284	.7644993
B:AGNSANG.GAIOLA					
1	30	.3241950	.2529009	-.1789279	.8273179
6	30	.3715283	.2529009	-.1315946	.8746512
12	28	.8008560	.2630795	.2774837	1.3242284

Multiple range analysis for AGNSANG.AGUR by AGNSANG.DAI

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
7	14	.0572854	X
4	27	.3307407	X
2	47	1.1085531	X

contrast	difference	+/- limits
2 - 4	0.77781	0.63852 *
2 - 7	1.05127	0.80527 *
4 - 7	0.27346	0.87124

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for AGNSANG.AGUR by AGNSANG.GAIOLA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	30	.3241950	X
6	30	.3715283	X
12	28	.8008560	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 6	-0.04733	0.68267
1 - 12	-0.47666	0.69504
6 - 12	-0.42933	0.69504

* denotes a statistically significant difference.

cAnalysis of Variance for AGSANG1.AGUR - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:AGSANG1.DAI	.0769536	2	.0384768	.357	.7020
B:AGSANG1.GAIOLA	.1057648	2	.0528824	.490	.6158

RESIDUAL 4.5285227 42 .1078220

TOTAL (CORRECTED) 4.7827319 46

12 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.
Table of Least Squares Means for AGSANG1.AGUR

		95% Confidence			
Level	Count	Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	47	.1790095	.0927327	-.0081758	.3661947
A:AGSANG1.DAI					
2	36	.2289499	.0557532	.1164095	.3414904
4	8	.2434142	.1383957	-.0359438	.5227722
7	3	.0646642	.2040007	-.3471205	.4764490
B:AGSANG1.GAIOLA					
1	25	.1143452	.0796659	-.0464642	.2751546
6	13	.2392903	.1311787	-.0255000	.5040806
12	9	.1833929	.1445478	-.1083836	.4751693

Multiple range analysis for AGSANG1.AGUR by AGSANG1.DAI

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
7	3	.0646642	X
2	36	.2289499	X
4	8	.2434142	X

contrast	difference	+/- limits
2 - 4	-0.01446	0.29376
2 - 7	0.16429	0.42169
4 - 7	0.17875	0.44873

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for AGSANG1.AGUR by AGSANG1.GAIOLA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	25	.1143452	X
12	9	.1833929	X
6	13	.2392903	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 6	-0.12495	0.25529
1 - 12	-0.06905	0.28319
6 - 12	0.05590	0.28742

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for AGSANG.AGPL - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:AGSANG.GAIOLA	1.8202731	2	.9101366	3.486	.0400
B:AGSANG.DAI	.0170795	2	.0085398	.033	.9678
RESIDUAL	10.703560	41	.2610624		
TOTAL (CORRECTED)	13.295286	45			

1 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for AGSANG.AGPL

95% Confidence					
Level	Count	Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	46	.4681667	.1373117	.1907961	.7455372
A:AGSANG.GAIOLA					
1	28	.1713519	.1113936	-.0536638	.3963675
6	9	.7215741	.2172944	.2826380	1.1605101
12	9	.5115741	.2172944	.0726380	.9505101
B:AGSANG.DAI					
2	33	.5021481	.0915412	.3172344	.6870619
4	9	.4690370	.2078175	.0492444	.8888297
7	4	.4333148	.2818631	-.1360503	1.0026800

Multiple range analysis for AGSANG.AGPL by AGSANG.GAIOLA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups	
1	28	.1713519	X	
12	9	.5115741	XX	
6	9	.7215741	X	
contrast		difference +/- limits		
1 - 6		-0.55022 0.43517 *		
1 - 12		-0.34022 0.43517		
6 - 12		0.21000 0.48654		

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for AGSANG.AGPL by AGSANG.DAI

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups	
7	4	.4333148	X	
4	9	.4690370	X	
2	33	.5021481	X	
contrast		difference +/- limits		
2 - 4		0.03311 0.43517		
2 - 7		0.06883 0.58080		
4 - 7		0.03572 0.62022		

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for ANCISTO.EFX - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
COVARIATES					
ANCISTO.VIDA	1059.8498	1	1059.8498	8.437	.0058
MAIN EFFECTS					
A:ANCISTO.INOCUL	57.788882	2	28.894441	.230	.7955
B:ANCISTO.SANGRIA	38.226418	1	38.226418	.304	.5899
RESIDUAL	5401.8064	43	125.62341		
TOTAL (CORRECTED)	7073.6667	47			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for ANCISTO.EFX

Level	Count	Average	95% Confidence Std. Error for mean		
GRAND MEAN	48	11.333333	1.6177621	8.0700549	14.596612
A:ANCISTO.INOCUL					
1	16	11.444377	3.1258784	5.1389932	17.749761
6	16	9.933000	2.8330590	4.2182788	15.647722
12	16	12.622622	2.9643658	6.6430344	18.602210
B:ANCISTO.SANGRIA					
S	24	10.417486	2.3181084	5.7414995	15.093471
N	24	12.249181	2.3181084	7.5731952	16.925167

One-Way Analysis of Variance

Data: ANCISTO.EFX

Level codes: ANCISTO.VIDA

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	4308.4906	16	269.28066	3.019	.0041
Within groups	2765.1760	31	89.19923		
Total (corrected)	7073.6667	47			

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for ANCISTO.EFX by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
10	1	.000000	X
15	5	1.400000	XX
11	1	2.000000	XXX
13	2	2.250000	XXXX
16	5	2.400000	XXXXX
12	4	2.500000	XXXXX
14	3	3.333333	XXXXXX
17	2	4.500000	XXXXXXX
20	2	12.000000	XXXXXXXX
28	1	14.000000	XXXXXXXX
42	1	16.000000	XXXXXXXX
103	16	18.281250	X X XX
25	1	20.500000	XXXXXXXX
24	1	24.500000	X XX XXX
22	1	30.500000	X
41	1	32.000000	X
21	1	35.500000	X

contrast	difference	+/- limits
10 - 11	-2.00000	27.2473
10 - 12	-2.50000	21.5409
10 - 13	-2.25000	23.5969
10 - 14	-3.33333	22.2473
10 - 15	-1.40000	21.1057
10 - 16	-2.40000	21.1057
10 - 17	-4.50000	23.5969

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for ANCISTO.EFX by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
10 - 20		-12.0000	23.5969
10 - 21		-35.5000	27.2473 *
10 - 22		-30.5000	27.2473 *
10 - 24		-24.5000	27.2473
10 - 25		-20.5000	27.2473
10 - 28		-14.0000	27.2473
10 - 41		-32.0000	27.2473 *
10 - 42		-16.0000	27.2473
10 - 103		-18.2813	19.8597
11 - 12		-0.50000	21.5409
11 - 13		-0.25000	23.5969
11 - 14		-1.33333	22.2473
11 - 15		0.60000	21.1057
11 - 16		-0.40000	21.1057
11 - 17		-2.50000	23.5969
11 - 20		-10.0000	23.5969
11 - 21		-33.5000	27.2473 *
11 - 22		-28.5000	27.2473 *
11 - 24		-22.5000	27.2473
11 - 25		-18.5000	27.2473
11 - 28		-12.0000	27.2473
11 - 41		-30.0000	27.2473 *
11 - 42		-14.0000	27.2473
11 - 103		-16.2813	19.8597
12 - 13		0.25000	16.6855
12 - 14		-0.83333	14.7152
12 - 15		1.10000	12.9245
12 - 16		0.10000	12.9245
12 - 17		-2.00000	16.6855
12 - 20		-9.50000	16.6855
12 - 21		-33.0000	21.5409 *
12 - 22		-28.0000	21.5409 *
12 - 24		-22.0000	21.5409 *
12 - 25		-18.0000	21.5409
12 - 28		-11.5000	21.5409
12 - 41		-29.5000	21.5409 *
12 - 42		-13.5000	21.5409
12 - 103		-15.7813	10.7704 *
13 - 14		-1.08333	17.5881
13 - 15		0.85000	16.1197
13 - 16		-0.15000	16.1197
13 - 17		-2.25000	19.2668
13 - 20		-9.75000	19.2668
13 - 21		-33.2500	23.5969 *
13 - 22		-28.2500	23.5969 *
13 - 24		-22.2500	23.5969
13 - 25		-18.2500	23.5969
13 - 28		-11.7500	23.5969

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for ANCISTO.EFX by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

13 - 41	-29.7500	23.5969 *
13 - 42	-13.7500	23.5969
13 - 103	-16.0313	14.4501 *
14 - 15	1.93333	14.0705
14 - 16	0.93333	14.0705
14 - 17	-1.16667	17.5881
14 - 20	-8.66667	17.5881
14 - 21	-32.1667	22.2473 *
14 - 22	-27.1667	22.2473 *
14 - 24	-21.1667	22.2473
14 - 25	-17.1667	22.2473
14 - 28	-10.6667	22.2473
14 - 41	-28.6667	22.2473 *
14 - 42	-12.6667	22.2473
14 - 103	-14.9479	12.1217 *
15 - 16	-1.00000	12.1854
15 - 17	-3.10000	16.1197
15 - 20	-10.6000	16.1197
15 - 21	-34.1000	21.1057 *
15 - 22	-29.1000	21.1057 *
15 - 24	-23.1000	21.1057 *
15 - 25	-19.1000	21.1057
15 - 28	-12.6000	21.1057
15 - 41	-30.6000	21.1057 *
15 - 42	-14.6000	21.1057
15 - 103	-16.8813	9.87128 *
16 - 17	-2.10000	16.1197
16 - 20	-9.60000	16.1197
16 - 21	-33.1000	21.1057 *
16 - 22	-28.1000	21.1057 *
16 - 24	-22.1000	21.1057 *
16 - 25	-18.1000	21.1057
16 - 28	-11.6000	21.1057
16 - 41	-29.6000	21.1057 *
16 - 42	-13.6000	21.1057
16 - 103	-15.8813	9.87128 *
17 - 20	-7.50000	19.2668
17 - 21	-31.0000	23.5969 *
17 - 22	-26.0000	23.5969 *
17 - 24	-20.0000	23.5969
17 - 25	-16.0000	23.5969
17 - 28	-9.50000	23.5969
17 - 41	-27.5000	23.5969 *
17 - 42	-11.5000	23.5969
17 - 103	-13.7813	14.4501
20 - 21	-23.5000	23.5969
20 - 22	-18.5000	23.5969
20 - 24	-12.5000	23.5969
20 - 25	-8.50000	23.5969

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for ANCISTO.EFX by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
20 - 28		-2.00000	23.5969
20 - 41		-20.0000	23.5969
20 - 42		-4.00000	23.5969
20 - 103		-6.28125	14.4501
21 - 22		5.00000	27.2473
21 - 24		11.0000	27.2473
21 - 25		15.0000	27.2473
21 - 28		21.5000	27.2473
21 - 41		3.50000	27.2473
21 - 42		19.5000	27.2473
21 - 103		17.2188	19.8597
22 - 24		6.00000	27.2473
22 - 25		10.0000	27.2473
22 - 28		16.5000	27.2473
22 - 41		-1.50000	27.2473
22 - 42		14.5000	27.2473
22 - 103		12.2188	19.8597
24 - 25		4.00000	27.2473
24 - 28		10.5000	27.2473
24 - 41		-7.50000	27.2473
24 - 42		8.50000	27.2473
24 - 103		6.21875	19.8597
25 - 28		6.50000	27.2473
25 - 41		-11.5000	27.2473
25 - 42		4.50000	27.2473
25 - 103		2.21875	19.8597
28 - 41		-18.0000	27.2473
28 - 42		-2.00000	27.2473
28 - 103		-4.28125	19.8597
41 - 42		16.0000	27.2473
41 - 103		13.7188	19.8597
42 - 103		-2.28125	19.8597

* denotes a statistically significant difference.

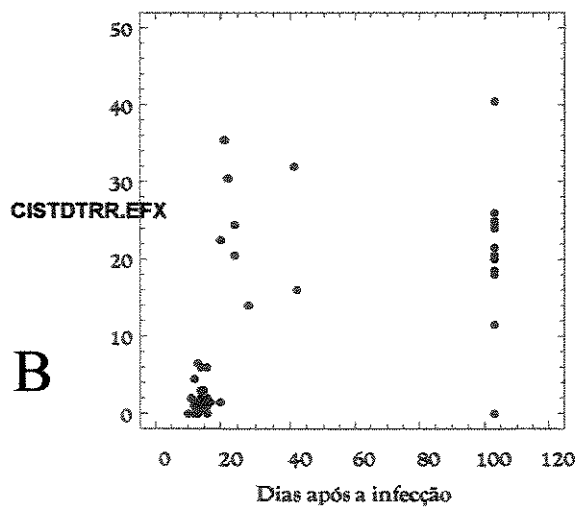
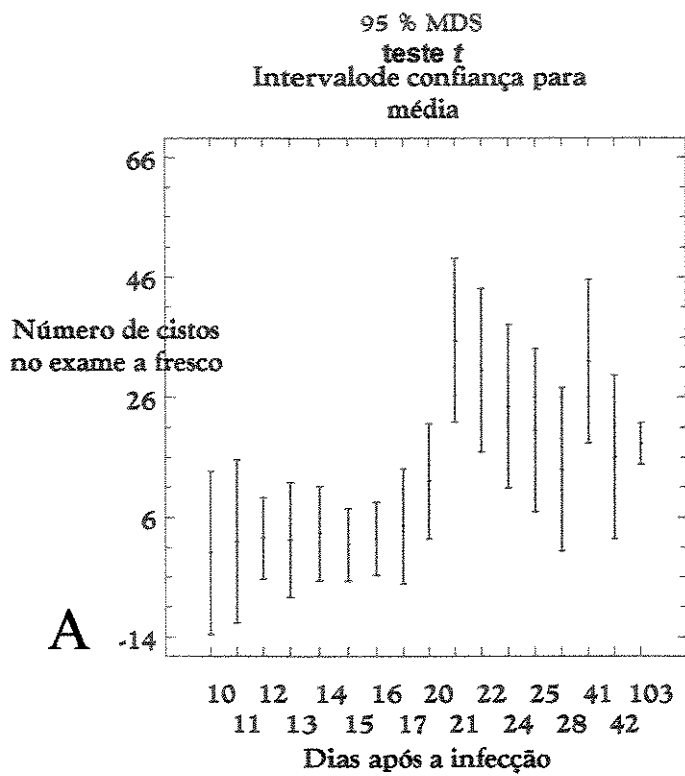


GRÁFICO 3 - A) Intervalo de confiança B) Dispersão de número de cistos no exame a fresco de cérebro de camundongos inoculados 1, 6 e 12 cistos de cepa P de *Toxoplasma gondii*, por período de tempo após a infecção ($p = 0,0041$) .

One-Way Analysis of Variance

Data: ANCISTO.MEDIA

Level codes: ANCISTO.VIDA

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	7.8039E0010	14	5.5742E0009	6.439	.0000
Within groups	2.0777E0010	24	8.6570E0008		
Total (corrected)	9.8816E0010	38			

9 missing value(s) have been excluded.

Table of means for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
11	1	6791.67	.000	29422.865	-36158.192 49741.53
12	4	6852.50	1471.241	14711.432	-14622.436 28327.43
13	1	14097.66	.000	29422.865	-28852.202 57047.52
14	2	8811.05	1330.455	20805.107	-21559.093 39181.18
15	5	5607.90	587.106	13158.305	-13599.864 24815.66
16	5	7805.83	1421.406	13158.305	-11401.928 27013.60
17	1	2404.34	.000	29422.865	-40545.522 45354.20
20	2	7801.06	3653.305	20805.107	-22569.083 38171.19
22	1	8286.79	.000	29422.865	-34663.072 51236.65
24	1	9662.14	.000	29422.865	-33287.722 52612.00
25	1	12719.64	.000	29422.865	-30230.222 55669.50
28	1	7236.72	.000	29422.865	-35713.142 50186.58
41	1	43061.46	.000	29422.865	111.598 86011.32
42	1	38948.07	.000	29422.865	-4001.792 81897.93
103	12	105574.41	12514.661	8493.649	93175.858 117972.97
Total	39	39430.88	4711.429	4711.429	32553.398 46308.36

Multiple range analysis for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
17	1	2404.34	X
15	5	5607.90	X
11	1	6791.67	X
12	4	6852.50	X

Multiple range analysis for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
28	1	7236.72	X
20	2	7801.06	X
16	5	7805.83	X
22	1	8286.79	X
14	2	8811.05	X
24	1	9662.14	X
25	1	12719.64	X
13	1	14097.66	X
42	1	38948.07	X
41	1	43061.46	XX
103	12	105574.41	X

contrast	difference	+/- limits
11 - 12	-60.8250	67909.7
11 - 13	-7305.99	85899.7
11 - 14	-2019.38	74391.3
11 - 15	1183.77	66537.6
11 - 16	-1014.16	66537.6
11 - 17	4387.33	85899.7
11 - 20	-1009.39	74391.3
11 - 22	-1495.12	85899.7
11 - 24	-2870.47	85899.7
11 - 25	-5927.97	85899.7
11 - 28	-445.050	85899.7
11 - 41	-36269.8	85899.7
11 - 42	-32156.4	85899.7
11 - 103	-98782.7	63220.5 *
12 - 13	-7245.16	67909.7
12 - 14	-1958.55	52602.6
12 - 15	1244.60	40745.8
12 - 16	-953.339	40745.8
12 - 17	4448.16	67909.7
12 - 20	-948.560	52602.6
12 - 22	-1434.29	67909.7
12 - 24	-2809.64	67909.7
12 - 25	-5867.14	67909.7
12 - 28	-384.225	67909.7
12 - 41	-36209.0	67909.7
12 - 42	-32095.6	67909.7
12 - 103	-98721.9	35068.4 *
13 - 14	5286.62	74391.3
13 - 15	8489.76	66537.6
13 - 16	6291.83	66537.6
13 - 17	11693.3	85899.7
13 - 20	6296.61	74391.3
13 - 24	4435.52	85899.7
13 - 25	1378.02	85899.7
13 - 28	6860.94	85899.7
13 - 41	-28963.8	85899.7

Multiple range analysis for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
13 - 42		-24850.4	85899.7
13 - 103		-91476.8	63220.5 *
14 - 15		3203.15	50819.0
14 - 16		1005.21	50819.0
14 - 17		6406.71	74391.3
14 - 20		1009.99	60740.3
14 - 22		524.255	74391.3
14 - 24		-851.095	74391.3
14 - 25		-3908.59	74391.3
14 - 28		1574.33	74391.3
14 - 41		-34250.4	74391.3
14 - 42		-30137.0	74391.3
14 - 103		-96763.4	46391.2 *
15 - 16		-2197.94	38415.5
15 - 17		3203.56	66537.6
15 - 20		-2193.16	50819.0
15 - 22		-2678.89	66537.6
15 - 24		-4054.24	66537.6
15 - 25		-7111.74	66537.6
15 - 28		-1628.82	66537.6
15 - 41		-37453.6	66537.6
15 - 42		-33340.2	66537.6
15 - 103		-99966.5	32331.5 *
16 - 17		5401.49	66537.6
16 - 20		4.77900	50819.0
16 - 22		-480.956	66537.6
16 - 24		-1856.31	66537.6
16 - 25		-4913.81	66537.6
16 - 28		569.114	66537.6
16 - 41		-35255.6	66537.6
16 - 42		-31142.2	66537.6
16 - 103		-97768.6	32331.5 *
17 - 20		-5396.72	74391.3
17 - 22		-5882.45	85899.7
17 - 24		-7257.80	85899.7
17 - 25		-10315.3	85899.7
17 - 28		-4832.38	85899.7
17 - 41		-40657.1	85899.7
17 - 42		-36543.7	85899.7
17 - 103		-103170.	63220.5 *
20 - 22		-485.735	74391.3
20 - 24		-1861.08	74391.3
20 - 25		-4918.58	74391.3
20 - 28		564.335	74391.3
20 - 41		-35260.4	74391.3
20 - 42		-31147.0	74391.3
20 - 103		-97773.4	46391.2 *
22 - 24		-1375.35	85899.7
22 - 25		-4432.85	85899.7
22 - 28		1050.07	85899.7

Multiple range analysis for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
22 - 41		-34774.7	85899.7
22 - 42		-30661.3	85899.7
22 - 103		-97287.6	63220.5 *
24 - 25		-3057.50	85899.7
24 - 28		2425.42	85899.7
24 - 41		-33399.3	85899.7
24 - 42		-29285.9	85899.7
24 - 103		-95912.3	63220.5 *
25 - 28		5482.92	85899.7
25 - 41		-30341.8	85899.7
25 - 42		-26228.4	85899.7
25 - 103		-92854.8	63220.5 *
28 - 41		-35824.7	85899.7
28 - 42		-31711.4	85899.7
28 - 103		-98337.7	63220.5 *
41 - 42		4113.39	85899.7
41 - 103		-62513.0	63220.5
42 - 103		-66626.3	63220.5 *

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for ANCISTO.MEDIA - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
COVARIATES					
ANCISTO.VIDA	6.0020E0010	1	6.0020E0010	97.062	.0000
MAIN EFFECTS					
A:ANCISTO.INOCUL	3.4348E0008	2	1.7174E0008	.278	.7592
B:ANCISTO.SANGRIA	2.4080E0007	1	2.4080E0007	.039	.8468
RESIDUAL	2.1025E0010	34	6.1837E0008		
TOTAL (CORRECTED)	9.8816E0010	38			

9 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for ANCISTO.MEDIA

Level	Count	Average	95% Confidence		for mean
			Std. Error		
GRAND MEAN	39	39271.919	3992.3876	31156.523	47387.314
A:ANCISTO.INOCUL					
1	13	38161.687	7426.1389	23066.445	53256.929
6	14	43335.235	6744.3312	29625.916	57044.554
12	12	36318.834	7452.7298	21169.541	51468.128
B:ANCISTO.SANGRIA					
S	19	40088.839	5852.9880	28191.368	51986.309
N	20	38454.999	5647.6408	26974.941	49935.056

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBES, M. V.; DIEZ, B.; GARCIA, RODRIGUEZ, J. A.; VIENS, P. & CISTERNA, R. Detection of circulating antigens in the diagnosis of acute toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 51 (4): 506-511, 1994.
- AMENDOEIRA, M. R. & COUTINHO, S. G. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the saliva and tonsils of a three year-old child. J. Infect. Dis., 145 (4): 587, 1982.
- ARAUJO, F. G.; WILLIAMS, D. M.; GRUMET, F. C. & REMINGTON, J. S. Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. Infect. Immun., 13 (5): 1528-1530, 1976.
- BARNERT, G.; HASSL, A. & ASPÖCK, H. Isoenzyme studies on *Toxoplasma gondii* isolates using isoelectric focusing. Zentralbl. Bakterirol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A, 268: 476-481, 1988.
- BOTTONE, E. Diagnosis of acute pulmonary toxoplasmosis by visualization of invasive and intracellular tachyzoites in Giemsa-stained smears of bronchoalveolar lavage fluid. J. Clin. Microbiol., 29 (11): 2626-2627, 1991.
- BROWN, C. R. & MCLEOD, R. Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. J. Immunol., 145 (10): 3438-3441, 1990.
- CAMARGO, M. E. Comparative evaluation of toxoplasmosis indirect fluorescent and Sabin-Feldman dye tests in a thousand human sera. A few unexpected results. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 8 (2): 62-68, 1966.
- CARAMELLO, P.; FORNA, B; LUCCHINI, A.; POLLONO, A. M.; SINICCO, A. & GIONNINI, P. Meningoencephalitis caused by *Toxoplasma gondii* diagnosed from cerebrospinal fluid in an HIV-positive patient. Scand. J. Infectious Dis., 25 (5): 663-666, 1993.
- CATHIE, J.A.B. *Toxoplasma* adenopathy in a child with isolation of the parasite Lancet, 02:115-6, 1954.

- CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, S.; BEAUCHAMPS, P.; FOURMAUX, M. P.; CAMUS, D.; CAPRON, Q. & DUBREMETZ, J. F. Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. J. Biological Chemistry, 269 (3): 16217-16222, 1994.
- CHIARI, C. A. & NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J., 79 (3): 337-340, 1984.
- CONLEY, F. K. & JENKINS, K. A. Immunohistological study of the anatomic relationship of *Toxoplasma* antigens to the inflammatory response in the brains of mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun., 31: 1184-1192, 1981.
- CONLEY, F. K.; JENKINS, K. A. & REMINGTON, J. S. *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate *Toxoplasma* in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. Hum. Pathol., 12 (8): 690-698, 1981.
- CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P. & SANTORO, F. Restriction-fragment-length polymorphism among *Toxoplasma gondii* strains. Parasitol. Res., 77: 166-168, 1991.
- DARCY, F.; CHARIF, H.; CARON, H.; DELSLEÉ, D.; PIERCE, R. J.; CESBRON-DELAUW, M. F.; DECOSTER, A. & CAPRON, A. Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive epitopes. Parasitol. Res., 76: 473-478, 1990.
- DARDÉ, M. L.; BOUTETILLE, B. & PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. Am. J. Trop. Med. Hyg., 39 (6): 551-558, (7-329), 1988.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B. & PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. J. Parasitol., 78 (5): 786-794, 1992.

- DECOSTER, A.; DARCY, F & CAPRON, A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. Clin. Exp. Immunol., 73: 376-382, 1988.
- DEROUIN, F. & GARIN, J. F. *Toxoplasma gondii*: Blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. Exp. Parasitol., 73: 460-468, 1991.
- DESMONTS, G. & COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. New England J. Med., 290: 1110-1116, 1974.
- DESMONTS, G.; DAFFOS, F.; FORESTIER, F.; CAPELLA-PAVLOSVSKI, M.; THULLIEZ, PH. & CHARTIER, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Lancet, March 2,: 500-504, 1985.
- DIEGO, J. A.; VASQUEZ, J. J.; PENIN, P.; FERNANDEZ, J.; SANCHES, S. & GAMALLO, C. Use of murine subinoculation for the diagnosis and isolation of toxoplasmosis in HIV-infected patients with persistent lymphadenopathy. Ann. Trop. Med. Parasitol., 87 (2): 179-184, 1993.
- DUBEY, J. P. & FRENKEL, J. K. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. J. Parasitol., 59 (3): 505-512, 1973.
- DUBEY, J. P. & SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. Am. J. Vet. Res., 41: 784-795, 1980.
- DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P.; LOPES, C.W.G.; WILLIAMS, J.F.; WILLIAMS, C.S.F. & WEISBRODE, S.E. Caprine toxoplasmosis: Abortion, clinical signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Am. J. Vet. Res., 41 (7):1072-6, 1980.
- EL-SAYED KHALIFA, K.; ROTH, A.; ROTH, B.; ARASTEH, K. N.; JANITSCHKE, K. Value of PCR for Evaluating Occurrence of Parasitemia in Immunocompromised Patients with Cerebral and

Extracerebral Toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol., 32 (11): 2813-2819, 1994.

ESPINO, A. M.; MARCET, R. & FINLAY, C. M. Detection of circulating excretory secretory antigens in human fascioliasis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol., 28 (12): 2637-2640, 1990.

FACHADO, A.; LONTE, L.; ROJAS, L.; ALBERTI, E. & MACHIN, R. Technique for the detection of *Toxoplasma gondii* antigens in mouse urine. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J., 85 (1): 65-68, 1990.

FACHADO, A.; FONTE, L.; ALBERTI, E.; HADAD, P.; FONSECA, L.; MACHIN, R.; FINLAY, C. Usefulness of the detection of *Toxoplasma gondii* antigens in AIDS patients. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 36 (6): 525-529, 1994.

FERGUSON, D. J. P. & HUTCHISON, W. M. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. Virchows Arch. A, 4111: 39-43, 1987.

FREILIJ, H. L.; CORRAL, R. S.; KATZIN, A. M. & GRINSTEIN, S. Antigenuria in infants with acute and congenital Chaga's Disease. J. Clin. Microbiol., 25 (1): 133-137, 1987.

FRENKEL, J. K. & ESCAJADILLO, A. Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36 (3): 517- 522. 1987.

FRENKEL, J. K.; NELSON, B. & ARIAS- STELLA, J. Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis. Clinical and experimental aspects. Hum. Pathol., 6: 97-111, 1975.

GARDNER, I. D. & REMINGTON, J. S. Age-related decline in resistance of mice to infection with intracellular pathogens. Infect. Immun., 16: 593-598, 1977.

GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. Methods Immunology. (3th ed.). Addison-Wesley Publishing Company Inc., 1977.

- GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y. HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 153 (6): 2533-2543, 1994.
- GOLDIN, A. J.; HALL, A.; SARKER, R. N.; WARHURST, D. C. & MILES, M. A. Diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in Bangladeshi infants: faecal antigen capture ELISA. Trans. R. S. Trop. Med. Hyg., 87: 428-432, 1993.
- GROSS, U.; ROSS, T.; APPOLDT, D. & HEESEMAN, J. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. J. Clin. Microbiol., 30 (6): 1436-1441, 1992.
- GUIMARÃES, F. N. Toxoplasmose humana. Meningoencefalomielite toxoplasmica: Ocorrência em adulto e em recém nascido. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J., 38 (3): 257-321, 1943.
- HAFID, J.; RABERIN, H.; POZZETTO, B.; AKONO, Z. Y.; TRAN MANH SUNG, R.; JANA, M. & GAUDIN, O. Comparison of excretory/secretory and circulating antigens of *Toxoplasma gondii* by enzyme immunoassay and immunoblotting. Int. J. Parasitol., 22 (8): 1083-1088, 1992.
- HAKES, T. B. & ARMSTRONG, D. Toxoplasmosis: problems en diagnostic and treatment. Cancer, 52:1535- 1540, 1983.
- HANDMAN, E. & REMINGTON, J. S. Antibody responses to *Toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence. Infect. Immun., 29 (1): 215-220, 1980.
- HANDMAN, E.; GODING, J. W. & REMINGTON, J. S. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 124: 2578-2583, 1980.

- HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analitical Biochemisty, 48: 422-427 1972.
- HASSL, A. & ASPÖCK, H. Detection and characterization of circulating antigens in acute experimental infections of mice with four different strains of *Toxoplasma gondii*. Zbl. Bakt. Hyg., A, 272: 526-534, 1990.
- HASSL, A. ASPÖCK, H. & FLAMM, H. Evidence of structural proteins of *Toxoplasma gondii* in sera of experimentally infected mice. Zentralbl. Backteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A, 270: 310-312, 1988a.
- HASSL, A.; ASPÖCK, H. & FLAMM, H. Circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in patients with AIDS: Significance of detection and structural properties. Zentralbl. Backteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A, 270: 302-309, 1988b.
- HOFFLIN, J. M. & REMINGTON, J. S. Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood of a patient with AIDS. Arch. Intern. Med., 145: 925-926, 1985.
- HUANG, T. E. & CHOU, S. M. Occlusive hypertrophic arteritis as the cause of discrete necrosis in CNS toxoplasmosis in the acquired immuno deficiency syndrome. Hum. Pathol, 19 (10): 1210-1214, 1988.
- HUDSON, A. T. Atavaquone - A novel broad-spectrum anti-infective drug. Parasitol. Today, 9 (2): 66-68, 1993.
- HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN-CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: Regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. Infect. Immun., 62 (7): 2818-2824, 1994.
- HUSKINSON, K.; STEPICK-BIEK, P. & REMINGTON, J. S. Detection of antigens in urine during acute toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol., 27 (5): 1099-1101, 1989.

- JACOBS, L.; MELTON, M.L.; & COOK, M.K Observations on Toxoplasmosis in dogs. J. Parasitol., 41 (4):353-61, 1966.
- KATZIN, A. M.; KIMURA, E. S.; ALEXANDRE, C. O. P. & VAL RAMOS A. M. S. Detection of antigens in urine of patients with acute falciparum and vivax malaria infections. J. Trop. Med. Hyg., 45 (4): 453-462, 1991.
- KAUFMAN, H. E.; REMINGTON, J. S. & JACOBS, L. Toxoplasmosis: the nature of virulence. Am. J. Ophthalmol., 46: 255-261, 1958.
- KHAN, I.; MATSUURA, T. & KASPER, L. H. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. Infect. Immun., 62 (5): 1639-1642, 1994.
- KOSKINIEMI, M.; LAPPALAINEN, M. & HEDMAN, K.. Toxoplasmosis needs evaluation. An overview and proposals. Am. J. Dis. Child., 143: 724-728, 1989.
- LAPPIN, M. R.; GREENE, C.; PRESTWOOD, A. K.; DAWE, D. L. & TARLETON, R. L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in the serum of cats. Am. J. Vet. Res., 50 (9): 1586-1590, 1989.
- LUFT, B. J. & REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin. Infect. Dis., 15: 211-222, 1992.
- MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. Noções fundamentais de cariometria. In: --. Práticas de biologia celular. Ed. Edgard Blücher Ltda. 1980. 35-37 pp.
- MINEO, J. R. & KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). Exp. Parasitol., 79 (1): 11-20, 1994.
- NOVATI, R.; CASTAGNA, A.; MORSICA, G.; VAGO, L.; TAMBUSSI, G.; GHEZZI, S.; GERVASONI, C.; BISSON, C.; MONFORTE, A. D.; & LAZZARIN, A. Polymerase chain reaction for

- Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. AIDS, 8 (12): 1691-1694, 1994.
- OMATA, Y.; NISHIMOTO, N.; RAMOS, M. I.; YANO, K. & NAKABAYASHI Virulence of *Toxoplasma gondii* (RH-cyst III strain) cultured in mouse embryo cells. Jpn. J. Parasitol., 36 (3): 179-182, 1987.
- PATEL, B. YOUNG, Y.; DUFFY, K.; TANNER, R. P.; JOHNSON, J. & HOLLIMAN, R.E. Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. J. Med. Microbiol., 38: 286-292, 1993.
- PARMLEY, S. F.; GROSS, U.; SUCHARCZUK, A.; WINDECK, T.; SGARLATO, G. D. & REMINGTON, J. S. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii* . J. Parasitol., 80 (2): 293-301, 1994a.
- PARMLEY, S. F.; YANG, S.; HARTH, L. D.; SUCHARCZUK, A & REMINGTON, J. S. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. Mol. Biochem. Parasitol., 66 (2): 283-296, 1994b.
- PINON, J. M.; FOUDRINER, F.; MOUGEOT, G.; MARX, C.; AUBERT, D.; TOUPANCE, O.; NIEL, G.; DANIS, M.; CAMERLYNCK, P.; REMY, G.; FROTTIER, J.; JOLLY, D.; BESSIERES, M. H.; RICHARD-LENOBLE, D. & BONHOMME, A. Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays for anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and analytical study of specific IgG in immunodeficient patients. J. Clin. Microbiol., 33 (4): 878-884, 1995.
- REMINGTON, J. S. & CAVANAUGH, E. N. Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. N. Engl. J. Med., 273 (24): 1308-1310, 1965.
- REMINGTON, J. S. & DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Infections diseases of the fetus and newborn infant. 3 ed. Philadelphia. Saunders. 1990. 89-195 pp.

- RINDER, H.; THOMSCHKE, A.; DARDE, M. L.; LOESCHER, T. Specific DNA polymorphism discriminate between virulence and non., virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. Mol. Biochem. Parasitol., 69 (1): 123-126, 1995.
- ROCHA, R. Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de ratos e camundongos experimentalmente infectados. Belo Horizonte, Dep. de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. 84 pp. 1988 (dissertação de Mestrado).
- ROCHA, R. J.; TAFURI, W. L.; CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de camundongos durante a fase aguda da infecção experimental. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 35 (4): 307-313, 1993.
- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis en children. J. Am. Med. Ass., 116: 801-7, 1941.
- SACKS, J. J.; ROBERTO, R. R. & BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. J. Am. Vet. Med. Assoc., 248: 1728-1732, 1982.
- SIBLEY, L. D. & BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature, 359: 82-85, 1992.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. Statistical Methods. (7 ed.). Ames. Iowa University Press. 1980.
- STAHL, W. & TUREK, G. Chronic murine toxoplasmic: clinicopathologic characterization of a progressive wasting syndrome. Ann. Trop. Med. Parasitol., 82 (1): 35-48, 1988.
- SUZUKI, Y.; YANG, Q.; CONLEY, F. K.; ABRAMS, J. & REMINGTON, J. S. Antibody against interleykin-6 reduces inflammation and numbers of cyst in brains of mice with toxoplasmic encephalitis. Infect. Immun., 62 (7): 2773-2778, 1994.
- TAKAHASHI, E. E. H. & ROSSI, C. L. Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* spIgA antibodies in acute toxoplasmosis. J. Clin. Pathol., 47 (12): 1101-1104, 1994.

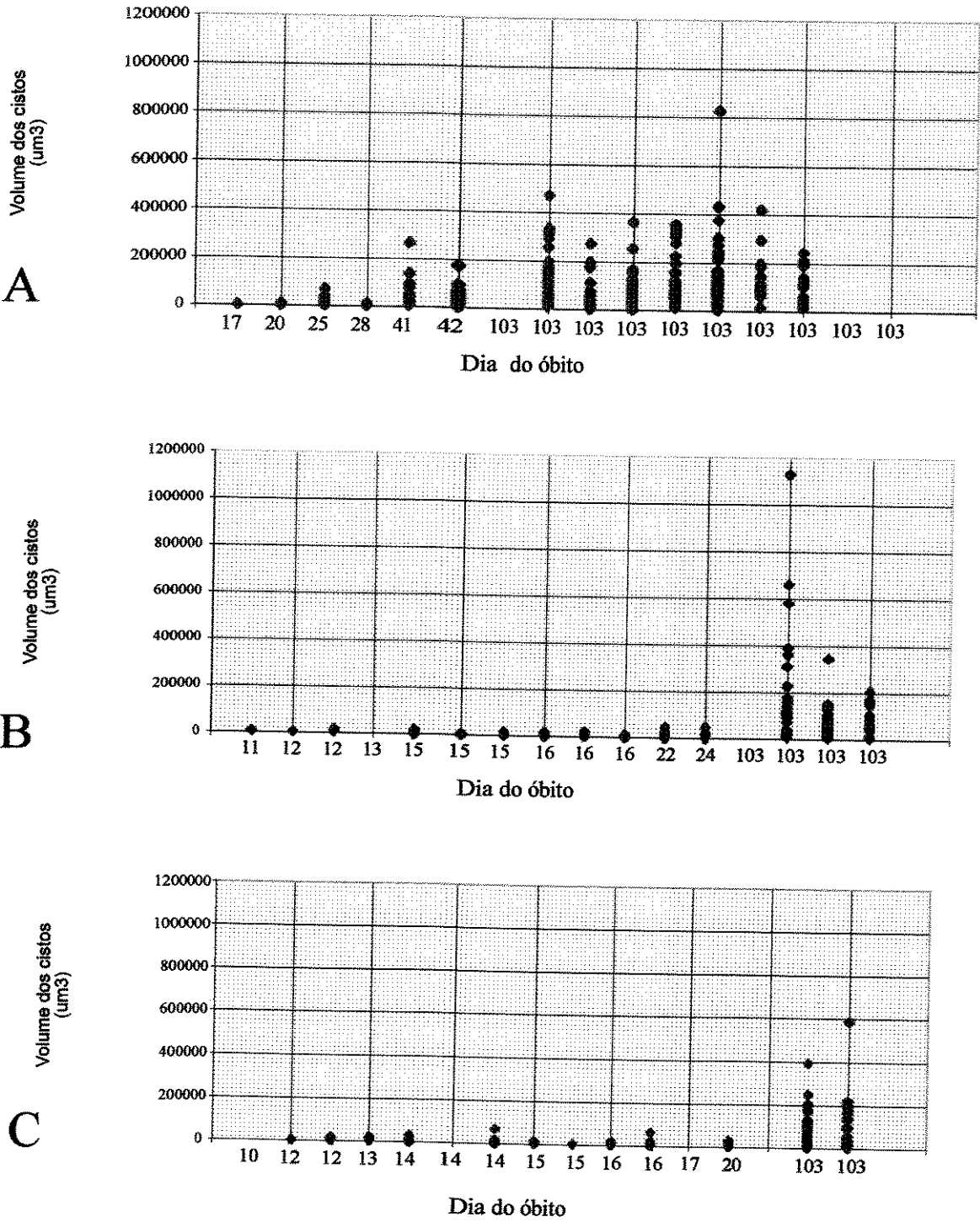


Figura 13- Dispersão do volume dos cistos por dia de óbito em animais inoculados com cistos da linhagem P de *T. gondii*. A) Animais inoculados com 1 cisto. B) Animais inoculados com 6 cistos. C) Animais inoculados com 12 cistos.

5. DISCUSSÃO

Esta é a primeira vez que se demonstra a ocorrência de antígenos de *T. gondii* na urina e plasma de camundongos na fase crônica da infecção. Os relatos anteriores demonstraram a antigenúria em camundongos durante a fase aguda com linhagem de alta virulência do parasito (HUSKINSON *et alii*, 1989; FACHADO *et alii*, 1990).

A técnica de ELISA para captura de antígenos, apresentou boa sensibilidade, já que foi possível detectar níveis de proteína na concentração de 0,05 µg/ml, ao contrário do que foi obtido por FACHADO *et alii* (1990), cujo método de coaglutinação apresentou sensibilidade de 0,118 µg de proteínas/ml. A reprodutibilidade foi satisfatória, uma vez que os padrões com diferentes concentrações de proteínas, incluídos em todas as placas, apresentaram curva semelhante.

Foi possível detectar antígenos na urina de camundongos sem necessidade de concentrar as amostras, recurso requerido para detectar antígeno de *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* na urina de pacientes, mesmo durante a fase aguda da infecção. (FREILIJ *et alii*, 1987, KATZIN *et alii*, 1991; UMEZAWA *et alii*, 1993).

As amostras de urina obtidas de camundongos infectados com a linhagem N (Tabela 1) expressaram maior concentração de antígenos do que aquelas obtidas no mesmo período de animais submetidos à linhagem P do parasito (Figuras 3 e 4). Dados semelhantes foram observados por ACEBES *et alii* (1994) que investigaram antígenos circulantes com a técnica de ELISA de captura em camundongos infectados com três linhagens de *T. gondii*. Destas linhagens, duas apresentavam perfil semelhante às estudadas por nós, uma de alta virulência e outra subaguda. A concentração de antígenos circulantes nos animais inoculados com a linhagem de alta virulência foi muito maior do que aquela observada nos animais submetidos à infecção com a linhagem subaguda.

As Figuras 3 e 4 ilustram a cinética de antigenúria e antigenemia. No decorrer da infecção persiste a eliminação de antígenos na fase crônica. Os antígenos de *T. gondii* foram detectados no plasma dos animais infectados antes de serem detectados na urina (Figura 4), independente do inóculo. Os antígenos foram observados na urina a partir de 4 DAI, concordante com HUSKINSON *et alii* (1989), enquanto FACHADO *et alii* (1990) observaram eliminação de antígenos a partir de 2 DAI.

Foram detectadas concentrações antigênicas maiores na fase aguda do que na fase crônica da infecção em camundongos inoculados com *T. gondii* (Figura 3). Estes dados sugerem que antígenos de taquizoitos são predominantemente reconhecidos pela ELISA de captura de antígenos. Entretanto não podemos descartar a possibilidade de reação com antígenos de bradizoitos uma vez que é descrita a existência de antígenos comuns entre bradizoitos e taquizoitos (CESBRON-DELAUW *et alii*, 1994).

As concentrações antigênicas detectadas na urina sofrem um decréscimo após a fase aguda (36 DAI). Foram observados picos de eliminação de antígenos na fase crônica da infecção (Figura 3A) indicando a possibilidade de reagudização. FREILIJ *et alii* (1987), estudando pacientes chagásicos, observaram associação entre eliminação de antígenos na urina e fase ativa ou infecção recente pelo *T. cruzi*. Entretanto, KATZIN *et alii* (1991), observaram que a antigenúria não está relacionada com a parasitemia. ROCHA (1988) demonstrou a ocorrência de formas do *T. gondii* na urina de camundongos durante a fase aguda de camundongos e durante a na fase aguda e crônica, em ratos imunocompetentes. Estes dados parecem indicar, que para *T. gondii*, a ocorrência de reagudização pode estar

associada com o aparecimento de antígenos na urina de animais imunocompetentes infectados.

Os anticorpos foram detectados no sangue dos animais infectados com cistos da linhagem P de *T. gondii*, a partir de 8 DAI. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por HANDMAN & REMINGTON (1980), que demonstraram anticorpos circulantes em camundongos infectados com linhagens avirulenta e de relativa virulência de *T. gondii*, a partir de 8 DAI, pela reação de IFI e Sabin-Feldman. Estes autores observaram títulos ascendentes de anticorpos até 35 ou 43 DAI, dependendo da linhagem e consideraram que os animais estavam na fase crônica da infecção a partir de 50 DAI, ocasião em que os títulos de anticorpos se estabilizaram. Em nossos experimentos, os títulos de anticorpos circulantes aumentaram até 36 DAI. O período compreendido entre 2 e 40 DAI foi considerado fase aguda da infecção e o período posterior, a partir de 40 DAI, fase crônica. Todos os animais morreram no período coincidente com a fase aguda da infecção, exceto dois animais inoculados com 1 cisto do grupo AS que morreram 41 e 42 DAI, no início da fase crônica. Esta mortalidade, considerada tardia, pode ter ocorrido em decorrência de uma reagudização, embora não tenham sido demonstrados antígenos na urina

destes animais aos 40 DAI. Porém, aos 44 DAI os animais deste grupo eliminaram antígeno na urina.

Para comprovar a hipótese de reagudização utilizando a técnica de ELISA para captura de antígenos, torna-se necessária a caracterização molecular dos antígenos eliminados na urina e sua respectiva comparação com os de taquizoitos e bradizoitos, já descritos. O antígeno denominado SAG1 (P30), proteína altamente imunogênica de taquizoitos tem despertado interesse como reagente para diagnóstico, componente de vacina e seu papel na invasão celular (MINEO & KASPER, 1994). Existe discriminação antigênica entre taquizoitos de linhagens virulentas e avirulentas. O uso de anticorpos monoclonais para antígeno de superfície P22, expresso em 25 linhagens de *T. gondii* (4 virulentas e 21 avirulentas), revelou que dois alelos estão envolvidos, um deles idêntico ao gene da linhagem virulenta RH (PARMLEY *et alii*, 1994a). Recentemente, foi descrito um antígeno abundante na matriz de cistos que não foi detectado em taquizoitos (PARMLEY *et alii*, 1994b).

O monitoramento de anticorpos circulantes pela reação de IFI concomitante à reação de antígenos na ELISA, buscou relacionar a cinética dos antígenos com a de anticorpos. Os resultados ilustrados na Figura 7

indicam que a diminuição dos níveis antigênicos no plasma está relacionado com a ascensão dos títulos de anticorpos.

O perfil de mortalidade apresentado pelos animais infectados com 10^5 taquizoitos da linhagem N (Figura 1), onde todos morreram entre 5 e 6 DAI, foi similar ao apresentado pelos camundongos infectados com o mesmo inóculo do parasito da linhagem RH (HUSKINSON *et alii*, 1989), com sobrevivência de 6 a 8 dias. Resultados compatíveis também foram descritos por DEROUIN & GARIN (1991). Estes dados parecem indicar que os mecanismos que levam à morte dos animais inoculados com linhagens de alta virulência devem ser semelhantes.

A imunidade protetora contra *T. gondii* é mediada pela resposta celular do hospedeiro. A sobrevivência de camundongos na fase aguda da toxoplasmose é atribuída à IL-12, citocina produzida por macrófagos e monócitos e que estimula a produção de interferon gama pelas células NK (GAZZINELLI *et alii*, 1994). O papel protetor de IL-12 foi evidenciado em dois experimentos. Camundongos imunodeficientes scid/scid infectados com *T. gondii*, quando tratados com anticorpo policlonal anti-IL12 expressaram mortalidade precoce na fase aguda (HUNTER *et alii*, 1994). Camundongos imunocompetentes (A/J) aumentam a sobrevida na fase aguda da

toxoplasmose se recebem injeção de IL-12 exógena até o 3º dia da infecção. Após este período, a IL-12 exógena perde a capacidade de controlar a infecção (KHAN *et alii*, 1994).

No decorrer da infecção com a linhagem P, houve perda de peso dos animais concomitante ao período de maior mortalidade (Figuras 3 e 5). Houve recuperação parcial de peso dos animais infectados, em contraposição com os achados de STAHL & TUREK (1988). Estes autores infectaram camundongos heterogênicos Nya com 8 cistos da linhagem CS, descrevendo uma síndrome degenerativa onde os animais evoluem com marcante perda de peso, sintomas neurológicos e morte. A diferença observada em nossos resultados pode estar associada à linhagem do parasito e do hospedeiro.

O encontro dos primeiros cistos aos 11 DAI é concordante com os achados de CONLEY & JENKINS (1981) e REMINGTON & CAVANAUGH (1965) que observaram o aparecimento dos primeiros cistos de *T. gondii* entre 6 e 12 dias após a infecção.

Quando se analisa a dispersão do número de cistos em função do tempo de infecção até 20 DAI, o número de cistos encontrados é baixo

(Figura 9 - valores no interior do círculo). Existe um outro padrão de comportamento que corresponde aos animais que morrem entre 20 e 42 DAI. A média do número de cistos em animais que foram sacrificados com 103 DAI foi similar aos valores obtidos nos animais que morreram entre 20 e 42 DAI. Entretanto, foi possível observar em alguns animais sacrificados no final do experimento valores compatíveis aos dos animais que morreram até 20 DAI. Estes dados indicam que deve haver uma assincronia no início do aparecimento de cistos no cérebro, sendo que alguns animais iniciam a produção de cistos no cérebro mais tardiamente. Outro fato que reforça esta hipótese é a constatação de que a maioria dos cistos presentes no cérebro destes animais apresentam pequeno volume (inferiores a $100000 \mu\text{m}^3$ - Fig. 13A).

Na população de camundongos submetida a vários inóculos de cistos da linhagem P de *T. gondii*, foi possível observar que mesmo aqueles indivíduos que evoluíram para a fase crônica, apresentam volumes de cistos similares aos encontrados na fase aguda (Figura 10). Foi possível constatar a predominância de cistos pequenos no cérebro 103 DAI (Fig. 10C e Fig. 13).

O encontro de cistos pequenos na fase crônica (Figura 14) sugere a ocorrência de neoformação. WONG & REMINGTON (1993) consideram a

possibilidade de bradizoitos escaparem de cistos sem romper completamente a parede dos cistos para gerarem cistos filhos em células adjacentes. CONLEY & JENKINS (1981), estudando cistos no cérebro de camundongos por reações imunohistoquímicas sugeriram a disseminação de taquizoitos, via hematogênica para explicar recrudescência da parasitemia. Da mesma forma HOFLIN & REMINGTON (1985) postulam que as lesões cerebrais de aidéticos resultam de reativação em órgãos periféricos com disseminação de taquizoitos via hematogênica para o sistema nervoso central. FRENKEL & ESCAJADILLO (1987), estudando nódulos microgliais em macacos, sugerem a ruptura de cistos como possível mecanismo para induzir a imunopatologia. Estes mecanismos poderiam também explicar a neoformação de cistos no cérebro de animais infectados com *T. gondii*.

A melhor forma de caracterizar inequivocamente a fase ativa da infecção pelo *T. gondii*, ainda está para ser determinada. Na tentativa de encontrar um método diagnóstico não invasivo, tem-se procurado indicadores de fase ativa da infecção na resposta imune do hospedeiro e na demonstração de DNA do parasito utilizando técnicas de biologia molecular ou na detecção de antígenos específicos através de técnicas imunológicas em fluidos corporais.

A IgA tem sido apontada como um eficiente indicador de fase aguda da infecção em casos de pacientes com linfadenopatia (TAKAHASHI & ROSSI, 1994), desaparecendo da circulação rapidamente (GROSS *et alii*, 1992). PINON *et alii* (1995), estudando casos de toxoplasmose ativa relacionada à síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), detectou a IgA em 38% dos casos, enquanto a IgM ajudou no diagnóstico apenas de 1 em 71 pacientes. Entretanto PATEL *et alii* (1993), relatam que enquanto pacientes aidéticos com toxoplasmose primária sempre produzem IgM e IgA, não há diferença significativa na frequência de detecção de IgA entre pacientes aidéticos com toxoplasmose crônica e aqueles que apresentam doença cerebral resultante de reativação da infecção.

EL-SAYED-KHALIFA *et alii* (1994), usando a reação de polimerase em cadeia para amplificação de DNA de *T. gondii*, demonstrou parasitemia em 55,5% a 77,8% em casos de toxoplasmose extracerebral, mas em apenas 13,3% dos pacientes com toxoplasmose cerebral, indicando a utilidade da técnica em casos em que há uma infecção disseminada pelo parasita. NOVATI *et alii* (1994) tiveram êxito na amplificação do DNA do parasita no fluido cérebro espinhal em 42,1% dos casos comprovados de encefalite toxoplásmica, observando melhores resultados quando o fluido era colhido e

examinado na primeira semana de terapia anti-*Toxoplasma*. A detecção de DNA do parasita apresenta limitações, uma vez que é difícil localizar regiões no genoma que representem as diferenças entre linhagens do *T. gondii* (RINDER *et alii*, 1995).

HAFID *et alii* (1995) compararam a técnica de ELISA de captura de antígenos com a técnica de “imunoblotting” para avaliar antigenemia em gestantes e aidéticos na fase aguda da infecção pelo *T. gondii*. O teste de “imunoblotting” detectou mais casos do que a de ELISA de captura e os casos de reativação só foram encontrados no grupo de aidéticos, onde existia antigenemia. Estes resultados demonstram a validade em detectar antígeno circulante para diagnóstico da toxoplasmose humana, principalmente em pacientes imunocomprometidos onde a resposta sorológica está prejudicada. FACHADO *et alii* (1994) demonstraram antígenos de *T. gondii* na urina em todos os pacientes aidéticos que apresentaram sintomas neurológicos devido à reativação de toxoplasmose crônica. Estes autores também sugerem que o monitoramento de antígenos de *T. gondii* na urina de pacientes aidéticos pode ser útil para orientar a terapia de modo a impedir o aparecimento da encefalite toxoplásmica porque os sintomas e antigenúria desaparecem com a terapia adequada.

Provavelmente será necessário utilizar mais de uma técnica para demonstrar a fase ativa do *T. gondii*, uma vez que nenhuma tem se mostrado capaz de caracterizá-la em todos os caso de toxoplasmose clínica.

Os nossos dados indicam que a detecção de antígenos no sangue e urina deve ser usada como alternativa de diagnóstico, uma vez que foi observado ocorrência intermitente de antígenos de *T. gondii* no sangue e urina de animais imunocompetentes.

Adicionalmente, a persistência de antigenúria e antigenemia (Fig. 4) no decorrer da infecção, associada à constatação de cistos pequenos na fase crônica (Fig. 13), sugere que ocorre reagudização da toxoplasmose em camundongos imunocompetentes.

6. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES.

1. Foi possível demonstrar a ocorrência de antígenos de *T. gondii* na urina e plasma, na fase aguda e crônica da infecção experimental em camundongos inoculados com a linhagem P de *T. gondii*, independente do número de cistos inoculados.
2. A técnica de ELISA para captura de antígenos foi desenvolvida para avaliar a concentração de antígenos de *T. gondii* na urina de camundongos experimentalmente infectados. Esta técnica mostrou alta reprodutibilidade e sensibilidade com limite inferior de 0,05 µg de proteínas/ml.
3. O número e volume médio dos cistos presentes no cérebro de camundongos experimentalmente infectados com a linhagem P de *T. gondii*, aumentam com o tempo de infecção e independe do número de cistos inoculados.
4. Na fase crônica da infecção com *T. gondii* em camundongos observa-se a ocorrência simultânea de cistos grandes e pequenos, indicando neoformação de cistos.
5. A análise de volume de cistos é um bom parâmetro para avaliar a neoformação, permitindo estudar o fenômeno da reativação da infecção pelo *T. gondii*.
6. A antigenúria e antigenemia persiste no decorrer da infecção, associada à neoformação de cistos indicando a ocorrência de reagudização durante a fase crônica da toxoplasmose em camundongos.

7. ANEXO

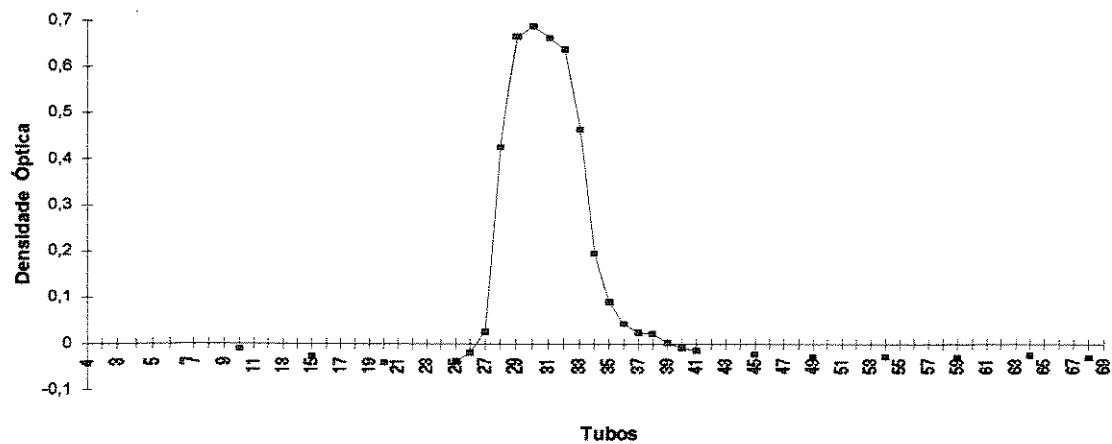


Figura 1. Densidade óptica a 280 nm das frações eluídas da cromatografia de soro humano anti-*Toxoplasma gondii* em coluna de DEAE-celulose. (Coluna de 1,9 x 32,4cm, 0.9ml/min, a 4°C, de 5,5 ml de soro, precipitado com sulfato de amônio e dialisado com tampão fosfato 0,0175M, pH=6,3).

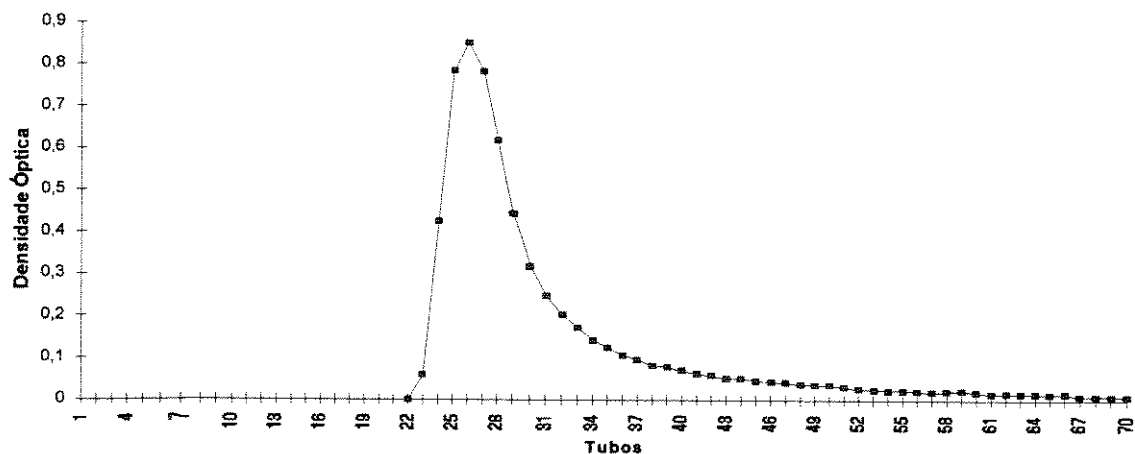


Figura 2. Densidade óptica a 280 nm das frações eluídas da cromatografia de soro de coelho anti-*Toxoplasma gondii* em coluna de DEAE-celulose. (Coluna de 1,9 x 32,4cm, 0.9ml/min, a 4°C, de 6,0ml de soro, precipitado com sulfato de amônio e dialisado com tampão fosfato 0,0175M, pH=6,3).

Anexo Estadístico					
Analysis of Variance for ANCIST.VIDA - Type III Sums of Squares					
Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:ANCIST.INOCUL	13166.828	2	6583.4140	5.322	.0092
B:ANCIST.SANGRIA	2938.331	1	2938.3308	2.376	.1315
RESIDUAL	47002.410	38	1236.9055		
TOTAL (CORRECTED)	63535.333	41			
1 missing values have been excluded.					
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

Table of Least Squares Means for ANCIST.VIDA

95% Confidence					
Level	Count	Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	42	43.332135	5.4360664	32.324849	54.339421
A:ANCIST.INOCUL					
1	13	68.122515	9.7633314	48.353113	87.891918
6	14	35.701043	9.4317350	16.603078	54.799009
12	15	26.172846	9.0880476	7.770801	44.574892
B:ANCIST.SANGRIA					
S	21	34.924832	7.7019228	19.329498	50.520166
N	21	51.739438	7.7000358	36.147925	67.330951

Multiple range analysis for ANCIST.VIDA by ANCIST.INOCUL

Method: 95 Percent LSD

Level Count LS Mean Homogeneous Groups

12	15	26.172846	X
6	14	35.701043	X
1	13	68.122515	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 6	32.4215	27.5362 *
1 - 12	41.9497	26.9854 *
6 - 12	9.52820	26.5649

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for ANCIST.VIDA by ANCIST.SANGRIA

Method: 95 Percent LSD

Level Count LS Mean Homogeneous Groups

S	21	34.924832	X
N	21	51.739438	X

contrast	difference	+/- limits
S - N	-16.8146	22.0902

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for AGNSANG.AGUR - Type III Sums of Squares
Source of variation Sum of Squares d.f. Mean square F-ratio Sig. level

MAIN EFFECTS					
A:AGNSANG.DAI	17.307741	2	8.6538704	4.899	.0097
B:AGNSANG.GAIOLA	3.946826	2	1.9734131	1.117	.3320
RESIDUAL	146.60129	83	1.7662806		
TOTAL (CORRECTED)	168.00614	87			

6 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for AGNSANG.AGUR
95% Confidence

Level	Count	Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	88	.4988598	.1596924	.1811666	.8165530
A:AGNSANG.DAI					
2	47	1.1085531	.1939048	.7227975	1.4943088
4	27	.3307407	.2557690	-.1780881	.8395695
7	14	.0572854	.3554897	-.6499284	.7644993
B:AGNSANG.GAIOLA					
1	30	.3241950	.2529009	-.1789279	.8273179
6	30	.3715283	.2529009	-.1315946	.8746512
12	28	.8008560	.2630795	.2774837	1.3242284

Multiple range analysis for AGNSANG.AGUR by AGNSANG.DAI

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
7	14	.0572854	X
4	27	.3307407	X
2	47	1.1085531	X

contrast	difference	+/- limits
2 - 4	0.77781	0.63852 *
2 - 7	1.05127	0.80527 *
4 - 7	0.27346	0.87124

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for AGNSANG.AGUR by AGNSANG.GAIOLA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	30	.3241950	X
6	30	.3715283	X
12	28	.8008560	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 6	-0.04733	0.68267
1 - 12	-0.47666	0.69504
6 - 12	-0.42933	0.69504

* denotes a statistically significant difference.

cAnalysis of Variance for AGSANG1.AGUR - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:AGSANG1.DAI	.0769536	2	.0384768	.357	.7020
B:AGSANG1.GAIOLA	.1057648	2	.0528824	.490	.6158

RESIDUAL 4.5285227 42 .1078220

TOTAL (CORRECTED) 4.7827319 46

12 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.
Table of Least Squares Means for AGSANG1.AGUR

Level	Count	95% Confidence			
		Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	47	.1790095	.0927327	-.0081758	.3661947
A:AGSANG1.DAI					
2	36	.2289499	.0557532	.1164095	.3414904
4	8	.2434142	.1383957	-.0359438	.5227722
7	3	.0646642	.2040007	-.3471205	.4764490
B:AGSANG1.GAIOLA					
1	25	.1143452	.0796659	-.0464642	.2751546
6	13	.2392903	.1311787	-.0255000	.5040806
12	9	.1833929	.1445478	-.1083836	.4751693

Multiple range analysis for AGSANG1.AGUR by AGSANG1.DAI

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
7	3	.0646642	X
2	36	.2289499	X
4	8	.2434142	X

contrast	difference	+/- limits
2 - 4	-0.01446	0.29376
2 - 7	0.16429	0.42169
4 - 7	0.17875	0.44873

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for AGSANG1.AGUR by AGSANG1.GAIOLA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	25	.1143452	X
12	9	.1833929	X
6	13	.2392903	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 6	-0.12495	0.25529
1 - 12	-0.06905	0.28319
6 - 12	0.05590	0.28742

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for AGSANG.AGPL - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:AGSANG.GAIOLA	1.8202731	2	.9101366	3.486	.0400
B:AGSANG.DAI	.0170795	2	.0085398	.033	.9678
RESIDUAL	10.703560	41	.2610624		
TOTAL (CORRECTED)	13.295286	45			

1 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for AGSANG.AGPL

95% Confidence					
Level	Count	Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	46	.4681667	.1373117	.1907961	.7455372
A:AGSANG.GAIOLA					
1	28	.1713519	.1113936	-.0536638	.3963675
6	9	.7215741	.2172944	.2826380	1.1605101
12	9	.5115741	.2172944	.0726380	.9505101
B:AGSANG.DAI					
2	33	.5021481	.0915412	.3172344	.6870619
4	9	.4690370	.2078175	.0492444	.8888297
7	4	.4333148	.2818631	-.1360503	1.0026800

Multiple range analysis for AGSANG.AGPL by AGSANG.GAIOLA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups	
1	28	.1713519	X	
12	9	.5115741	XX	
6	9	.7215741	X	
contrast		difference +/- limits		
1 - 6		-0.55022	0.43517	*
1 - 12		-0.34022	0.43517	
6 - 12		0.21000	0.48654	

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for AGSANG.AGPL by AGSANG.DAI

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups	
7	4	.4333148	X	
4	9	.4690370	X	
2	33	.5021481	X	
contrast		difference +/- limits		
2 - 4		0.03311	0.43517	
2 - 7		0.06883	0.58080	
4 - 7		0.03572	0.62022	

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for ANCISTO.EFX - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
COVARIATES					
ANCISTO.VIDA	1059.8498	1	1059.8498	8.437	.0058
MAIN EFFECTS					
A:ANCISTO.INOCUL	57.788882	2	28.894441	.230	.7955
B:ANCISTO.SANGRIA	38.226418	1	38.226418	.304	.5899
RESIDUAL	5401.8064	43	125.62341		
TOTAL (CORRECTED)	7073.6667	47			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for ANCISTO.EFX

Level	Count	95% Confidence			
		Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	48	11.333333	1.6177621	8.0700549	14.596612
A:ANCISTO.INOCUL					
1	16	11.444377	3.1258784	5.1389932	17.749761
6	16	9.933000	2.8330590	4.2182788	15.647722
12	16	12.622622	2.9643658	6.6430344	18.602210
B:ANCISTO.SANGRIA					
S	24	10.417486	2.3181084	5.7414995	15.093471
N	24	12.249181	2.3181084	7.5731952	16.925167

One-Way Analysis of Variance

Data: ANCISTO.EFX

Level codes: ANCISTO.VIDA

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	4308.4906	16	269.28066	3.019	.0041
Within groups	2765.1760	31	89.19923		
Total (corrected)	7073.6667	47			

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for ANCISTO.EFX by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

10	1	.000000	X
15	5	1.400000	XX
11	1	2.000000	XXX
13	2	2.250000	XXXX
16	5	2.400000	XXXXX
12	4	2.500000	XXXXX
14	3	3.333333	XXXXXX
17	2	4.500000	XXXXXXX
20	2	12.000000	XXXXXXXX
28	1	14.000000	XXXXXXXX
42	1	16.000000	XXXXXXXX
103	16	18.281250	X X XX
25	1	20.500000	XXXXXXXX
24	1	24.500000	X XX XXX
22	1	30.500000	X
41	1	32.000000	X
21	1	35.500000	X

contrast	difference	+/-	limits
10 - 11	-2.00000		27.2473
10 - 12	-2.50000		21.5409
10 - 13	-2.25000		23.5969
10 - 14	-3.33333		22.2473
10 - 15	-1.40000		21.1057
10 - 16	-2.40000		21.1057
10 - 17	-4.50000		23.5969

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for ANCISTO.EFX by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
10 - 20		-12.0000	23.5969
10 - 21		-35.5000	27.2473 *
10 - 22		-30.5000	27.2473 *
10 - 24		-24.5000	27.2473
10 - 25		-20.5000	27.2473
10 - 28		-14.0000	27.2473
10 - 41		-32.0000	27.2473 *
10 - 42		-16.0000	27.2473
10 - 103		-18.2813	19.8597
11 - 12		-0.50000	21.5409
11 - 13		-0.25000	23.5969
11 - 14		-1.33333	22.2473
11 - 15		0.60000	21.1057
11 - 16		-0.40000	21.1057
11 - 17		-2.50000	23.5969
11 - 20		-10.0000	23.5969
11 - 21		-33.5000	27.2473 *
11 - 22		-28.5000	27.2473 *
11 - 24		-22.5000	27.2473
11 - 25		-18.5000	27.2473
11 - 28		-12.0000	27.2473
11 - 41		-30.0000	27.2473 *
11 - 42		-14.0000	27.2473
11 - 103		-16.2813	19.8597
12 - 13		0.25000	16.6855
12 - 14		-0.83333	14.7152
12 - 15		1.10000	12.9245
12 - 16		0.10000	12.9245
12 - 17		-2.00000	16.6855
12 - 20		-9.50000	16.6855
12 - 21		-33.0000	21.5409 *
12 - 22		-28.0000	21.5409 *
12 - 24		-22.0000	21.5409 *
12 - 25		-18.0000	21.5409
12 - 28		-11.5000	21.5409
12 - 41		-29.5000	21.5409 *
12 - 42		-13.5000	21.5409
12 - 103		-15.7813	10.7704 *
13 - 14		-1.08333	17.5881
13 - 15		0.85000	16.1197
13 - 16		-0.15000	16.1197
13 - 17		-2.25000	19.2668
13 - 20		-9.75000	19.2668
13 - 21		-33.2500	23.5969 *
13 - 22		-28.2500	23.5969 *
13 - 24		-22.2500	23.5969
13 - 25		-18.2500	23.5969
13 - 28		-11.7500	23.5969

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for ANCISTO.EFX by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
13 - 41		-29.7500	23.5969 *
13 - 42		-13.7500	23.5969
13 - 103		-16.0313	14.4501 *
14 - 15		1.93333	14.0705
14 - 16		0.93333	14.0705
14 - 17		-1.16667	17.5881
14 - 20		-8.66667	17.5881
14 - 21		-32.1667	22.2473 *
14 - 22		-27.1667	22.2473 *
14 - 24		-21.1667	22.2473
14 - 25		-17.1667	22.2473
14 - 28		-10.6667	22.2473
14 - 41		-28.6667	22.2473 *
14 - 42		-12.6667	22.2473
14 - 103		-14.9479	12.1217 *
15 - 16		-1.00000	12.1854
15 - 17		-3.10000	16.1197
15 - 20		-10.6000	16.1197
15 - 21		-34.1000	21.1057 *
15 - 22		-29.1000	21.1057 *
15 - 24		-23.1000	21.1057 *
15 - 25		-19.1000	21.1057
15 - 28		-12.6000	21.1057
15 - 41		-30.6000	21.1057 *
15 - 42		-14.6000	21.1057
15 - 103		-16.8813	9.87128 *
16 - 17		-2.10000	16.1197
16 - 20		-9.60000	16.1197
16 - 21		-33.1000	21.1057 *
16 - 22		-28.1000	21.1057 *
16 - 24		-22.1000	21.1057 *
16 - 25		-18.1000	21.1057
16 - 28		-11.6000	21.1057
16 - 41		-29.6000	21.1057 *
16 - 42		-13.6000	21.1057
16 - 103		-15.8813	9.87128 *
17 - 20		-7.50000	19.2668
17 - 21		-31.0000	23.5969 *
17 - 22		-26.0000	23.5969 *
17 - 24		-20.0000	23.5969
17 - 25		-16.0000	23.5969
17 - 28		-9.50000	23.5969
17 - 41		-27.5000	23.5969 *
17 - 42		-11.5000	23.5969
17 - 103		-13.7813	14.4501
20 - 21		-23.5000	23.5969
20 - 22		-18.5000	23.5969
20 - 24		-12.5000	23.5969
20 - 25		-8.50000	23.5969

* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for ANCISTO.EFX by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
20 - 28		-2.00000	23.5969
20 - 41		-20.0000	23.5969
20 - 42		-4.00000	23.5969
20 - 103		-6.28125	14.4501
21 - 22		5.00000	27.2473
21 - 24		11.0000	27.2473
21 - 25		15.0000	27.2473
21 - 28		21.5000	27.2473
21 - 41		3.50000	27.2473
21 - 42		19.5000	27.2473
21 - 103		17.2188	19.8597
22 - 24		6.00000	27.2473
22 - 25		10.0000	27.2473
22 - 28		16.5000	27.2473
22 - 41		-1.50000	27.2473
22 - 42		14.5000	27.2473
22 - 103		12.2188	19.8597
24 - 25		4.00000	27.2473
24 - 28		10.5000	27.2473
24 - 41		-7.50000	27.2473
24 - 42		8.50000	27.2473
24 - 103		6.21875	19.8597
25 - 28		6.50000	27.2473
25 - 41		-11.5000	27.2473
25 - 42		4.50000	27.2473
25 - 103		2.21875	19.8597
28 - 41		-18.0000	27.2473
28 - 42		-2.00000	27.2473
28 - 103		-4.28125	19.8597
41 - 42		16.0000	27.2473
41 - 103		13.7188	19.8597
42 - 103		-2.28125	19.8597

* denotes a statistically significant difference.

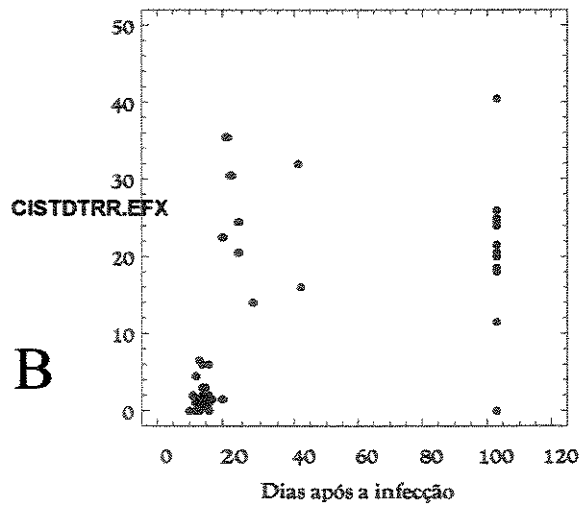
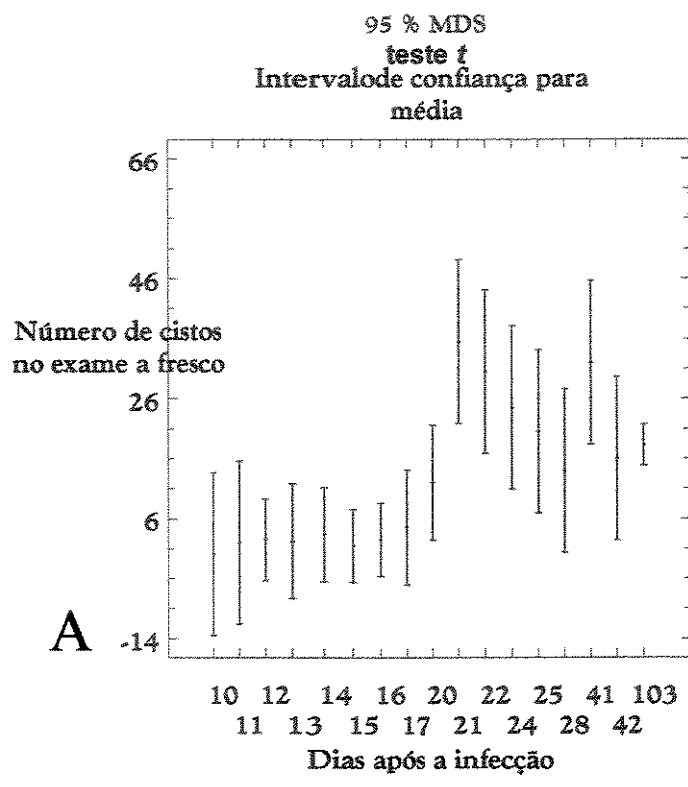


GRÁFICO 3 - A) Intervalo de confiança B) Dispersão de número de cistos no exame a fresco de cérebro de camundongos inoculados 1, 6 e 12 cistos de cepa P de *Toxoplasma gondii*, por período de tempo após a infecção (p = 0,0041) .

One-Way Analysis of Variance

Data: ANCISTO.MEDIA

Level codes: ANCISTO.VIDA

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	7.8039E0010	14	5.5742E0009	6.439	.0000
Within groups	2.0777E0010	24	8.6570E0008		
Total (corrected)	9.8816E0010	38			

9 missing value(s) have been excluded.

Table of means for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
11	1	6791.67	.000	29422.865	-36158.192 49741.53
12	4	6852.50	1471.241	14711.432	-14622.436 28327.43
13	1	14097.66	.000	29422.865	-28852.202 57047.52
14	2	8811.05	1330.455	20805.107	-21559.093 39181.18
15	5	5607.90	587.106	13158.305	-13599.864 24815.66
16	5	7805.83	1421.406	13158.305	-11401.928 27013.60
17	1	2404.34	.000	29422.865	-40545.522 45354.20
20	2	7801.06	3653.305	20805.107	-22569.083 38171.19
22	1	8286.79	.000	29422.865	-34663.072 51236.65
24	1	9662.14	.000	29422.865	-33287.722 52612.00
25	1	12719.64	.000	29422.865	-30230.222 55669.50
28	1	7236.72	.000	29422.865	-35713.142 50186.58
41	1	43061.46	.000	29422.865	111.598 86011.32
42	1	38948.07	.000	29422.865	-4001.792 81897.93
103	12	105574.41	12514.661	8493.649	93175.858 117972.97
Total	39	39430.88	4711.429	4711.429	32553.398 46308.36

Multiple range analysis for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
17	1	2404.34	X
15	5	5607.90	X
11	1	6791.67	X
12	4	6852.50	X

Multiple range analysis for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
28	1	7236.72	X
20	2	7801.06	X
16	5	7805.83	X
22	1	8286.79	X
14	2	8811.05	X
24	1	9662.14	X
25	1	12719.64	X
13	1	14097.66	X
42	1	38948.07	X
41	1	43061.46	XX
103	12	105574.41	X

contrast	difference	+/- limits
11 - 12	-60.8250	67909.7
11 - 13	-7305.99	85899.7
11 - 14	-2019.38	74391.3
11 - 15	1183.77	66537.6
11 - 16	-1014.16	66537.6
11 - 17	4387.33	85899.7
11 - 20	-1009.39	74391.3
11 - 22	-1495.12	85899.7
11 - 24	-2870.47	85899.7
11 - 25	-5927.97	85899.7
11 - 28	-445.050	85899.7
11 - 41	-36269.8	85899.7
11 - 42	-32156.4	85899.7
11 - 103	-98782.7	63220.5 *
12 - 13	-7245.16	67909.7
12 - 14	-1958.55	52602.6
12 - 15	1244.60	40745.8
12 - 16	-953.339	40745.8
12 - 17	4448.16	67909.7
12 - 20	-948.560	52602.6
12 - 22	-1434.29	67909.7
12 - 24	-2809.64	67909.7
12 - 25	-5867.14	67909.7
12 - 28	-384.225	67909.7
12 - 41	-36209.0	67909.7
12 - 42	-32095.6	67909.7
12 - 103	-98721.9	35068.4 *
13 - 14	5286.62	74391.3
13 - 15	8489.76	66537.6
13 - 16	6291.83	66537.6
13 - 17	11693.3	85899.7
13 - 20	6296.61	74391.3
13 - 24	4435.52	85899.7
13 - 25	1378.02	85899.7
13 - 28	6860.94	85899.7
13 - 41	-28963.8	85899.7

Multiple range analysis for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
13 - 42		-24850.4	85899.7
13 - 103		-91476.8	63220.5 *
14 - 15		3203.15	50819.0
14 - 16		1005.21	50819.0
14 - 17		6406.71	74391.3
14 - 20		1009.99	60740.3
14 - 22		524.255	74391.3
14 - 24		-851.095	74391.3
14 - 25		-3908.59	74391.3
14 - 28		1574.33	74391.3
14 - 41		-34250.4	74391.3
14 - 42		-30137.0	74391.3
14 - 103		-96763.4	46391.2 *
15 - 16		-2197.94	38415.5
15 - 17		3203.56	66537.6
15 - 20		-2193.16	50819.0
15 - 22		-2678.89	66537.6
15 - 24		-4054.24	66537.6
15 - 25		-7111.74	66537.6
15 - 28		-1628.82	66537.6
15 - 41		-37453.6	66537.6
15 - 42		-33340.2	66537.6
15 - 103		-99966.5	32331.5 *
16 - 17		5401.49	66537.6
16 - 20		4.77900	50819.0
16 - 22		-480.956	66537.6
16 - 24		-1856.31	66537.6
16 - 25		-4913.81	66537.6
16 - 28		569.114	66537.6
16 - 41		-35255.6	66537.6
16 - 42		-31142.2	66537.6
16 - 103		-97768.6	32331.5 *
17 - 20		-5396.72	74391.3
17 - 22		-5882.45	85899.7
17 - 24		-7257.80	85899.7
17 - 25		-10315.3	85899.7
17 - 28		-4832.38	85899.7
17 - 41		-40657.1	85899.7
17 - 42		-36543.7	85899.7
17 - 103		-103170.	63220.5 *
20 - 22		-485.735	74391.3
20 - 24		-1861.08	74391.3
20 - 25		-4918.58	74391.3
20 - 28		564.335	74391.3
20 - 41		-35260.4	74391.3
20 - 42		-31147.0	74391.3
20 - 103		-97773.4	46391.2 *
22 - 24		-1375.35	85899.7
22 - 25		-4432.85	85899.7
22 - 28		1050.07	85899.7

Multiple range analysis for ANCISTO.MEDIA by ANCISTO.VIDA

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
22 - 41		-34774.7	85899.7
22 - 42		-30661.3	85899.7
22 - 103		-97287.6	63220.5 *
24 - 25		-3057.50	85899.7
24 - 28		2425.42	85899.7
24 - 41		-33399.3	85899.7
24 - 42		-29285.9	85899.7
24 - 103		-95912.3	63220.5 *
25 - 28		5482.92	85899.7
25 - 41		-30341.8	85899.7
25 - 42		-26228.4	85899.7
25 - 103		-92854.8	63220.5 *
28 - 41		-35824.7	85899.7
28 - 42		-31711.4	85899.7
28 - 103		-98337.7	63220.5 *
41 - 42		4113.39	85899.7
41 - 103		-62513.0	63220.5
42 - 103		-66626.3	63220.5 *

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for ANCISTO.MEDIA - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
COVARIATES					
ANCISTO.VIDA	6.0020E0010	1	6.0020E0010	97.062	.0000
MAIN EFFECTS					
A:ANCISTO.INOCUL	3.4348E0008	2	1.7174E0008	.278	.7592
B:ANCISTO.SANGRIA	2.4080E0007	1	2.4080E0007	.039	.8468
RESIDUAL	2.1025E0010	34	6.1837E0008		
TOTAL (CORRECTED)	9.8816E0010	38			

9 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for ANCISTO.MEDIA

Level	Count	95% Confidence			
		Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	39	39271.919	3992.3876	31156.523	47387.314
A:ANCISTO.INOCUL					
1	13	38161.687	7426.1389	23066.445	53256.929
6	14	43335.235	6744.3312	29625.916	57044.554
12	12	36318.834	7452.7298	21169.541	51468.128
B:ANCISTO.SANGRIA					
S	19	40088.839	5852.9880	28191.368	51986.309
N	20	38454.999	5647.6408	26974.941	49935.056

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBES, M. V.; DIEZ, B.; GARCIA, RODRIGUEZ, J. A.; VIENS, P. & CISTERNA, R. Detection of circulating antigens in the diagnosis of acute toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 51 (4): 506-511, 1994.
- AMENDOEIRA, M. R. & COUTINHO, S. G. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the saliva and tonsils of a three year-old child. J. Infect. Dis., 145 (4): 587, 1982.
- ARAÚJO, F. G.; WILLIAMS, D. M.; GRUMET, F. C. & REMINGTON, J. S. Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. Infect. Immun., 13 (5): 1528-1530, 1976.
- BARNERT, G.; HASSL, A. & ASPÖCK, H. Isoenzyme studies on *Toxoplasma gondii* isolates using isoelectric focusing. Zentralbl. Bacteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A, 268: 476-481, 1988.
- BOTTONE, E. Diagnosis of acute pulmonary toxoplasmosis by visualization of invasive and intracellular tachyzoites in Giemsa-stained smears of bronchoalveolar lavage fluid. J. Clin. Microbiol., 29 (11): 2626-2627, 1991.
- BROWN, C. R. & MCLEOD, R. Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. J. Immunol., 145 (10): 3438-3441, 1990.
- CAMARGO, M. E. Comparative evaluation of toxoplasmosis indirect fluorescent and Sabin-Feldman dye tests in a thousand human sera. A few unexpected results. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 8 (2): 62-68, 1966.
- CARAMELLO, P.; FORNA, B; LUCCHINI, A.; POLLONO, A. M.; SINICCO, A. & GIONNINI, P. Meningoencephalitis caused by *Toxoplasma gondii* diagnosed from cerebrospinal fluid in an HIV-positive patient. Scand. J. Infectious Dis., 25 (5): 663-666, 1993.
- CATHIE, J.A.B. *Toxoplasma* adenopathy in a child with isolation of the parasite Lancet, 02:115-6, 1954.

- CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, S.; BEAUCHAMPS, P.; FOURMAUX, M. P.; CAMUS, D.; CAPRON, Q. & DUBREMETZ, J. F. Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. J. Biological Chemistry, 269 (3): 16217-16222, 1994.
- CHIARI, C. A. & NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J., 79 (3): 337-340, 1984.
- CONLEY, F. K. & JENKINS, K. A. Immunohistological study of the anatomic relationship of *Toxoplasma* antigens to the inflammatory response in the brains of mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun., 31: 1184-1192, 1981.
- CONLEY, F. K.; JENKINS, K. A. & REMINGTON, J. S. *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate *Toxoplasma* in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. Hum. Pathol., 12 (8): 690-698, 1981.
- CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P. & SANTORO, F. Restriction-fragment-length polymorphism among *Toxoplasma gondii* strains. Parasitol. Res., 77: 166-168, 1991.
- DARCY, F.; CHARIF, H.; CARON, H.; DELSLEÉ, D.; PIERCE, R. J.; CESBRON-DELAUW, M. F.; DECOSTER, A. & CAPRON, A. Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive epitopes. Parasitol. Res., 76: 473-478, 1990.
- DARDÉ, M. L.; BOUTETILLE, B. & PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. Am. J. Trop. Med. Hyg., 39 (6): 551-558, (7-329), 1988.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B. & PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. J. Parasitol., 78 (5): 786-794, 1992.

- DECOSTER, A.; DARCY, F & CAPRON, A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. Clin. Exp. Immunol., 73: 376-382, 1988.
- DEROUIN, F. & GARIN, J. F. *Toxoplasma gondii*: Blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. Exp. Parasitol., 73: 460-468, 1991.
- DESMONTS, G. & COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. New England J. Med., 290: 1110-1116, 1974.
- DESMONTS, G.; DAFFOS, F.; FORESTIER, F.; CAPELLA-PAVLOSVSKI, M.; THULLIEZ, PH. & CHARTIER, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Lancet, March 2,: 500-504, 1985.
- DIEGO, J. A.; VASQUEZ, J. J.; PENIN, P.; FERNANDEZ, J.; SANCHES, S. & GAMALLO, C. Use of murine subinoculation for the diagnosis and isolation of toxoplasmosis in HIV-infected patients with persistent lymphadenopathy. Ann. Trop. Med. Parasitol., 87 (2): 179-184, 1993.
- DUBEY, J. P. & FRENKEL, J. K. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. J. Parasitol., 59 (3): 505-512, 1973.
- DUBEY, J. P. & SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. Am. J. Vet. Res., 41: 784-795, 1980.
- DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P.; LOPES, C.W.G.; WILLIAMS, J.F.; WILLIAMS, C.S.F. & WEISBRODE, S.E. Caprine toxoplasmosis: Abortion, clinical signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Am. J. Vet. Res., 41 (7):1072-6, 1980.
- EL-SAYED KHALIFA, K.; ROTH, A.; ROTH, B.; ARASTEH, K. N.; JANITSCHKE, K. Value of PCR for Evaluating Occurrence of Parasitemia in Immunocompromised Patients with Cerebral and

- Extracerebral Toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol., 32 (11): 2813-2819, 1994.
- ESPINO, A. M.; MARCET, R. & FINLAY, C. M. Detection of circulating excretory secretory antigens in human fascioliasis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol., 28 (12): 2637-2640, 1990.
- FACHADO, A.; LONTE, L.; ROJAS, L.; ALBERTI, E. & MACHIN, R. Technique for the detection of *Toxoplasma gondii* antigens in mouse urine. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J., 85 (1): 65-68, 1990.
- FACHADO, A.; FONTE, L.; ALBERTI, E.; HADAD, P.; FONSECA, L.; MACHIN, R.; FINLAY, C. Usefulness of the detection of *Toxoplasma gondii* antigens in AIDS patients. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 36 (6): 525-529, 1994.
- FERGUSON, D. J. P. & HUTCHISON, W. M. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. Virchows Arch. A, 411: 39-43, 1987.
- FREILIJ, H. L.; CORRAL, R. S.; KATZIN, A. M. & GRINSTEIN, S. Antigenuria in infants with acute and congenital Chaga's Disease. J. Clin. Microbiol., 25 (1): 133-137, 1987.
- FRENKEL, J. K. & ESCAJADILLO, A. Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36 (3): 517- 522. 1987.
- FRENKEL, J. K.; NELSON, B. & ARIAS- STELLA, J. Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis. Clinical and experimental aspects. Hum. Pathol., 6: 97-111, 1975.
- GARDNER, I. D. & REMINGTON, J. S. Age-related decline in resistance of mice to infection with intracellular pathogens. Infect. Immun., 16: 593-598, 1977.
- GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. Methods Immunology. (3th ed.). Addison-Wesley Publishing Company Inc., 1977.

- GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y. HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 153 (6): 2533-2543, 1994.
- GOLDIN, A. J.; HALL, A.; SARKER, R. N.; WARHURST, D. C. & MILES, M. A. Diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in Bangladeshi infants: faecal antigen capture ELISA. Trans. R. S. Trop. Med. Hyg., 87: 428-432, 1993.
- GROSS, U.; ROSS, T.; APPOLDT, D. & HEESEMAN, J. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. J. Clin. Microbiol., 30 (6): 1436-1441, 1992.
- GUIMARÃES, F. N. Toxoplasmose humana. Meningoencefalomielite toxoplasmica: Ocorrência em adulto e em recém nascido. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J., 38 (3): 257-321, 1943.
- HAFID, J.; RABERIN, H.; POZZETTO, B.; AKONO, Z. Y.; TRAN MANH SUNG, R.; JANA, M. & GAUDIN, O. Comparison of excretory/secretory and circulating antigens of *Toxoplasma gondii* by enzyme immunoassay and immunoblotting. Int. J. Parasitol., 22 (8): 1083-1088, 1992.
- HAKES, T. B. & ARMSTRONG, D. Toxoplasmosis: problems en diagnostic and treatment. Cancer, 52:1535- 1540, 1983.
- HANDMAN, E. & REMINGTON, J. S. Antibody responses to *Toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence. Infect. Immun., 29 (1): 215-220, 1980.
- HANDMAN, E.; GODING, J. W. & REMINGTON, J. S. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 124: 2578-2583, 1980.

- HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analitical Biochemisty, 48: 422-427 1972.
- HASSL, A. & ASPÖCK, H. Detection and characterization of circulating antigens in acute experimental infections of mice with four different strains of *Toxoplasma gondii*. Zbl. Bakt. Hyg., A, 272: 526-534, 1990.
- HASSL, A. ASPÖCK, H. & FLAMM, H. Evidence of structural proteins of *Toxoplasma gondii* in sera of experimentally infected mice. Zentralbl. Backteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A, 270: 310-312, 1988a.
- HASSL, A.; ASPÖCK, H. & FLAMM, H. Circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in patients with AIDS: Significance of detection and structural properties. Zentralbl. Backteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A, 270: 302-309, 1988b.
- HOFFLIN, J. M. & REMINGTON, J. S. Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood of a patient with AIDS. Arch. Intern. Med., 145: 925-926, 1985.
- HUANG, T. E. & CHOU, S. M. Occlusive hypertrophic arteritis as the cause of discrete necrosis in CNS toxoplasmosis in the acquired immuno deficiency syndrome. Hum. Pathol, 19 (10): 1210-1214, 1988.
- HUDSON, A. T. Atavaquone - A novel broad-spectrum anti-infective drug. Parasitol. Today, 9 (2): 66-68, 1993.
- HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN-CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: Regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. Infect. Immun., 62 (7): 2818-2824, 1994.
- HUSKINSON, K.; STEPICK-BIEK, P. & REMINGTON, J. S. Detection of antigens in urine during acute toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol., 27 (5): 1099-1101, 1989.

- JACOBS, L.; MELTON, M.L.; & COOK, M.K. Observations on Toxoplasmosis in dogs. J. Parasitol., 41 (4):353-61, 1966.
- KATZIN, A. M.; KIMURA, E. S.; ALEXANDRE, C. O. P. & VAL RAMOS A. M. S. Detection of antigens in urine of patients with acute falciparum and vivax malaria infections. J. Trop. Med. Hyg., 45 (4): 453-462, 1991.
- KAUFMAN, H. E.; REMINGTON, J. S. & JACOBS, L. Toxoplasmosis: the nature of virulence. Am. J. Ophthalmol., 46: 255-261, 1958.
- KHAN, I.; MATSUURA, T. & KASPER, L. H. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. Infect. Immun., 62 (5): 1639-1642, 1994.
- KOSKINIEMI, M.; LAPPALAINEN, M. & HEDMAN, K.. Toxoplasmosis needs evaluation. An overview and proposals. Am. J. Dis. Child., 143: 724-728, 1989.
- LAPPIN, M. R.; GREENE, C.; PRESTWOOD, A. K.; DAWE, D. L. & TARLETON, R. L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in the serum of cats. Am. J. Vet. Res., 50 (9): 1586-1590, 1989.
- LUFT, B. J. & REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin. Infect. Dis., 15: 211-222, 1992.
- MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. Noções fundamentais de cariometria. In: --. Práticas de biologia celular. Ed. Edgard Blücher Ltda. 1980. 35-37 pp.
- MINEO, J. R. & KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). Exp. Parasitol., 79 (1): 11-20, 1994.
- NOVATI, R.; CASTAGNA, A.; MORSICA, G.; VAGO, L.; TAMBUSSI, G.; GHEZZI, S.; GERVASONI, C.; BISSON, C.; MONFORTE, A. D.; & LAZZARIN, A. Polymerase chain reaction for

Toxoplasma gondii DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. AIDS, 8 (12): 1691-1694, 1994.

OMATA, Y.; NISHIMOTO, N.; RAMOS, M. I.; YANO, K. & NAKABAYASHI Virulence of *Toxoplasma gondii* (RH-cyst III strain) cultured in mouse embryo cells. Jpn. J. Parasitol., 36 (3): 179-182, 1987.

PATEL, B. YOUNG, Y.; DUFFY, K.; TANNER, R. P.; JOHNSON, J. & HOLLIMAN, R.E. Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. J. Med. Microbiol., 38: 286-292, 1993.

PARMLEY, S. F.; GROSS, U.; SUCHARCZUK, A.; WINDECK, T.; SGARLATO, G. D. & REMINGTON, J. S. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii* . J. Parasitol., 80 (2): 293-301, 1994a.

PARMLEY, S. F.; YANG, S.; HARTH, L. D.; SUCHARCZUK, A & REMINGTON, J. S. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. Mol. Biochem. Parasitol., 66 (2): 283-296, 1994b.

PINON, J. M.; FOUDRINER, F.; MOUGEOT, G.; MARX, C.; AUBERT, D.; TOUPANCE, O.; NIEL, G.; DANIS, M.; CAMERLYNCK, P.; REMY, G.; FROTTIER, J.; JOLLY, D.; BESSIERES, M. H.; RICHARD-LENOBLE, D. & BONHOMME, A. Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays for anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and analytical study of specific IgG in immunodeficient patients. J. Clin. Microbiol., 33 (4): 878-884, 1995.

REMINGTON, J. S. & CAVANAUGH, E. N. Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. N. Engl. J. Med., 273 (24): 1308-1310, 1965.

REMINGTON, J. S. & DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Infections diseases of the fetus and newborn infant. 3 ed. Philadelphia. Saunders. 1990. 89-195 pp.

- RINDER, H.; THOMSCHKE, A.; DARDE, M. L.; LOESCHER, T. Specific DNA polymorphism discriminate between virulence and non., virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. Mol. Biochem. Parasitol., 69 (1): 123-126, 1995.
- ROCHA, R. Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de ratos e camundongos experimentalmente infectados. Belo Horizonte, Dep. de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. 84 pp. 1988 (dissertação de Mestrado).
- ROCHA, R. J.; TAFURI, W. L.; CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de camundongos durante a fase aguda da infecção experimental. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 35 (4): 307-313, 1993.
- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis en children. J. Am. Med. Ass., 116: 801-7, 1941.
- SACKS, J. J.; ROBERTO, R. R. & BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. J. Am. Vet. Med. Assoc., 248: 1728-1732, 1982.
- SIBLEY, L. D. & BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature, 359: 82-85, 1992.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. Statistical Methods. (7 ed.). Ames. Iowa University Press. 1980.
- STAHL, W. & TUREK, G. Chronic murine toxoplasmic: clinicopathologic characterization of a progressive wasting syndrome. Ann. Trop. Med. Parasitol., 82 (1): 35-48, 1988.
- SUZUKI, Y.; YANG, Q.; CONLEY, F. K.; ABRAMS, J. & REMINGTON, J. S. Antibody against interleukin-6 reduces inflammation and numbers of cyst in brains of mice with toxoplasmic encephalitis. Infect. Immun., 62 (7): 2773-2778, 1994.
- TAKAHASHI, E. E. H. & ROSSI, C. L. Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* sIgA antibodies in acute toxoplasmosis. J. Clin. Pathol., 47 (12): 1101-1104, 1994.

- TERRAGNA, A.; QUAGLIA, A. C.; MORANDI, N.; CANESSA, A.; PELEGRINO, C.; BORASI, F. & BARBIERI, A. Isolamento del *Toxoplasma gondii* dalla saliva. Ricerca sperimentale. Ann. Sclavo, 23 (4): 477-485, 1981.
- TORPIER, G.; CHARIF, H.; DARCY, F.; LIU, J.; DARDE, M-L. & CAPRON, A. *Toxoplasma gondii*: Differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. Exp. Parasitol., 77: 13-22, 1993.
- UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI-YASUDA, M.; SILVEIRA, J. F.; COTRIM, P. C. PARANHOS, G. & KATZIN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: Detection of a circulating antigen in urine of chagasic patients sharing common epitopes with an immunodominant repetitive antigen. Exp. Parasitol., 76: 352-357, 1993.
- UNGAR, B. L. P. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in faecal specimens. J. Clin. Microbiol., 28 (11): 2491-2495, 1990.
- VITOR, R. W. A.; PINTO, J. B. & CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 42 (2): 147-154, 1991.
- WATT, R. M.; PHILIP, A.; WOS, S. M. & SAM, G. J. Rapide assay form immunological detection of *Trichomonas vaginalis*. J. Clin. Microbiol., 2 (4): 551-555, 1986.
- WILLIAMS, D. M.; GRUMET, F. C. & REMINGTON, J. S. Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun., 19: 416-420, 1978.
- WONG, S-Y & REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS, 7 (3): 299-316, 1993.
- WOODISON, G. & SMITH, J. E. Identification of the dominant cyst antigens of *Toxoplasma*. Parasitol., 100: 389-392, 1990.