

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE TAQUIZOÍTOS
PERITONEAIS DE *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux,
1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) ISOLADOS DE UMA
GALINHA NATURALMENTE INFECTADA FRENTE A
CEPA CONGÊNITA**

WALTER FLAUSINO

1996

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE TAQUIZOÍTOS
PERITONEAIS DE *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909
(Apicomplexa: Toxoplasmatinae) ISOLADOS DE UMA GALINHA
NATURALMENTE INFECTADA FRENTE A CEPA CONGÊNITA**

WALTER FLAUSINO

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:

Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de *Magister
Scientiae* em Microbiologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

FEVEREIRO, 1996

TÍTULO DA TESE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE TAQUIZOÍTOS
PERITONEAIS DE *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909
(Apicomplexa: Toxoplasmatinae) ISOLADOS DE UMA GALINHA
NATURALMENTE INFECTADA FRENTE A CEPA CONGÊNITA**

AUTOR

WALTER FLAUSINO

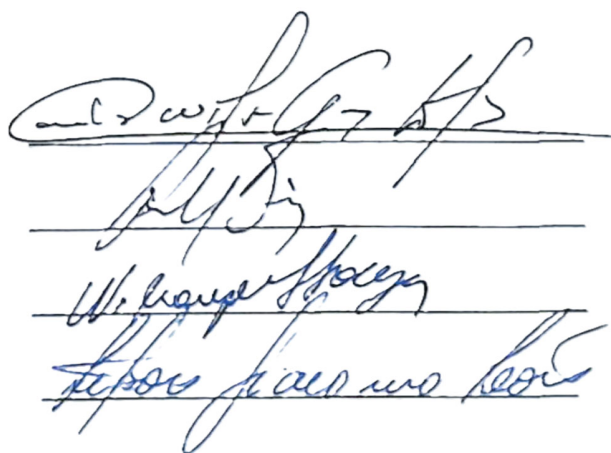
APROVADA EM 27/02/1996

Prof. Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

Prof. Dr. Ronald Bastos Freire

Prof. Dr. Wilson Jacinto Silva de Souza

Prof. Dr. Zelson Giacomo Loss



The image shows four handwritten signatures in blue ink, each on a horizontal line. The signatures are: 1. Carlos Wilson Gomes Lopes, 2. Ronald Bastos Freire, 3. Wilson Jacinto Silva de Souza, and 4. Zelson Giacomo Loss.

**NA VIDA,
NÃO VALE TANTO
O QUE TEMOS
NEM TANTO IMPORTA
O QUE SOMOS.**

EMMANUEL.

**VALE O QUE REALIZAMOS
COM AQUILO QUE POSSUIMOS
E ,ACIMA DE TUDO
IMPORTA
O QUE FAZEMOS DE NÓS .**

À minha esposa JOANA, as minhas filhas *OLIVIA*, *JÚLIA* e *RENATA* a quem peço desculpas pelos momentos em que não estive presente, para concluir a dissertação que ora defendo.

Ao Professor Dr. WILLHEM OTTO DANIEL MARTIN NEITZ, àquele que primeiro segurou em minhas mãos me ensinando a caminhar. Grande lição de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos Wilson Gomes Lopes, pela amizade de longa data, pelos primeiros trabalhos publicados, pela confiança, pela orientação e pela convivência;

Ao professor Ronald Bastos Freire, pela acolhida e colaboração na realização deste trabalho;

Ao Dr. Wilson Jacinto Silva de Souza, pelas críticas e sugestões na realização deste trabalho;

Um agradecimento muito especial ao grande amigo Cleber Oliveira Soares, acadêmico de Medicina Veterinária, que nos momentos mais críticos deste trabalho esteve sempre presente com a extrema boa vontade, o que lhe é peculiar;

Ao amigo professor Adivaldo Henrique da Fonseca, a amiga Márcia Mayumi Ishikawa e ao professor Natalino Hajime Yoshinari, pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento do trabalho;

Ao Dr. Ivo Baldani que abriu as portas do Laboratório de Bioquímica do CNPAB-EMBRAPA, Seropédica-RJ; onde o estudante de pós-graduação em Ciências do Solo, Jean, nos auxiliou na densitometria do material estudado;

Aos amigos Ângela Maria Veras Muniz e Walter Leira Teixeira Filho, por dividir momentos de ansiedade e aflição que um pós-graduando sofre durante essa etapa da vida.

Ao professor João Luiz Horácio Faccini, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária -Parasitologia Veterinária, pelo incentivo e presteza para a realização deste trabalho;

Ao professor Luiz Celso Hygino da Cruz, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, pela acolhida neste Curso;

Aos amigos Joana D'arc Herzog Soares, Antônio Lúcio Gomes de Souza, Mario Gatti, Elena Metti Fogo, Valmir Laurentino, Cleide Coelho, Aluísio Alves da Costa, Simoni Machado de Medeiros, pelo companheirismo;

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária e do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

WALTER FLAUSINO, Filho de João Flausino e Olivia Silvestre da Silva, nasceu a 10 de outubro de 1953, na então Universidade Rural do Brasil, Km 47 da Antiga Rio- São Paulo, como era mais conhecida.

Iniciou o estudo primário no Grupo Escolar Presidente Dutra, também situado no Km 47.

No colégio Fernando Costa, cursou o ginásio e o segundo grau profissionalizante, habilitando-se em Assistente de Administração em 1980.

No Colégio de Aplicação Emmanuel Leontisins, Fundação Educacional Campograndense (FEUC) em Campo Grande, Rio de Janeiro, em 1982, habilitou-se ainda a nível de segundo grau em Técnico em Patologia Clínica.

Em 1988, graduou-se em Ciências Biológicas, pela Sociedade de Ensino Superior de Nova Iguaçu (SESNI).

Ingressou no Curso de Pós- Graduação em Microbiologia Veterinária, a nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em março de 1994.

CONTEÚDO

	Págs.
1-INTRODUÇÃO.....	1
2-REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1- Histórico	3
2.2- Classificação.....	6
2.3- Morfologia.....	7
2.3.1- Oocistos	7
2.3.2- Taquizoítas	8
2.3.3- Bradizoítas	9
2.4- Biologia	10
2.4.1- Ciclo enteroepitelial.....	10

2.4.2- Ciclo extraintestinal	11
2.4.3- Outras considerações	12
2.5- Avaliação e caracterização do <i>Toxoplasma gondii</i>	12
2.5.1- Identificação fenotípica	13
2.5.2- Western Blotting	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1- Procedência dos animais	17
3.1.1- Procedência da ave	17
3.1.2- Procedência dos camundongos albinos	17
3.2- Isolamento do <i>Toxoplasma gondii</i> de galinha naturalmente infectada.....	18
3.3- Obtenção de <i>Toxoplasma gondii</i> amostra congênita	18
3.4- Análise dos taquizoítas mantidos em camundongos albinos.....	19
3.4.1-Comportamento dos taquizoítas em macrófagos.....	19
3.4.2- Mensuração e fotografia	19
3.4.3- Análise estatística.....	20
3.5- Obtenção dos taquizoítas.....	20
3.6- Purificação dos antígenos.....	20
3.7- Sonicação e dosagem de proteínas	21
3.8- Eletroforese em Gel de SDS-Poliacrilamida.....	22

3.9- Densitometria	23
3.10- Ensaio imunoenzimático Western Blotting	24
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1- Avaliação da capacidade de invasão dos taquizoítas à macrófagos peritoneais	26
4.2- Aspectos comparativos do perfil eletroforético das amostras cérebro e coração e da cepa “C”	31
4.3- Avaliação das concentrações de proteínas do material estudado	35
4.4- Western Blotting das amostras cérebro e coração e da cepa “C” frente a soro hiperimune de coelho e soro de cão	41
5 CONCLUSÕES	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
7- APÊNDICES.....	66

ÍNDICE DE TABELAS

	Págs.
TABELA 1. Aspectos comparativos dos zoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> , obtidos de lavado peritoneal de camundongos albinos	29
TABELA 2. Perfil protéico do extrato antigênico de taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> das amostras cérebro, coração e cepa "C"	33
TABELA 3. Concentrações proteicas das bandas nos zimogramas dos extratos de taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> analisados	39

INDICE DE FIGURAS

	Págs.
FIGURA 1. Variação de macrófagos parasitados por <i>Toxoplasma gondii</i> , em lavado peritoneal de camundongos albinos	27
FIGURA 2. Lavado peritoneal de camundongos albinos: taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> amostra cérebro (A), coração (B) e da cepa “C” (C), Giemsa (— = 10µm) .	30
FIGURA 3. Perfil proteico (Peso Molecular, Kd) das amostras cérebro (A), coração (B) e cepa “C” através de SDS-PAGE	34
FIGURA 4. Análise de proteínas (concentração): área integrada por densitometria, de taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> , amostra isolada do cérebro de <i>Gallus gallus domesticus</i> naturalmente infectado	36

FIGURA 5. Análise de proteínas (concentração): área integrada por densitometria, de taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, amostra isolada do coração de *Gallus gallus domesticus* naturalmente infectado 37

FIGURA 6. Análise de proteínas (concentração): área integrada por densitometria, de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* da amostra congênita isolada de um caso humano 38

FIGURA 7. Western Blotting de *Toxoplasma gondii*, amostra cérebro frente a soro de coelho e cão: cão negativo (A), cão positivo (B), coelho negativo (C), coelho positivo (D) e Peso Molecular (PM) 42

FIGURA 8. Western Blotting de *Toxoplasma gondii*, amostra coração frente a soro de coelho e cão: cão negativo (A), cão positivo (B), coelho negativo (C), coelho positivo (D) e Peso Molecular (PM) 43

FIGURA 9. Western Blotting de *Toxoplasma gondii*, cepa congênita frente a soro de coelho e cão: cão negativo (A), cão positivo (B), coelho negativo (C), coelho positivo (D) e Peso Molecular (PM) 44

INDICE DOS APÊNDICES

APÊNDICE 1. Curva de Calibração de BSA para Dosagem de Proteína 68

APÊNDICE 2. Curva de Calibração do Padrão de Peso Molecular 69

RESUMO

No presente trabalho, taquizoítas do *Toxoplasma gondii* isolados de cérebro e coração de uma galinha naturalmente infectada, procedente de área urbana do município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, e mantidos em camundongos albinos foram estudados e comparados à cepa congênita, oriunda do IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a fim de se avaliar as possíveis variações protéicas em cada uma das amostras. Após montagem dos géis, integrou-se os zimogramas por densitometria a laser, onde se analisou as áreas (concentrações) de proteínas em cada amostra. Os perfis protéicos eram distintos mesmo quando comparados à cepa “C”, evidenciando-se com isso, variações intraespecíficas observadas em uma espécie hospedeira. Da mesma maneira, ao se analisar os zimogramas, observou-se que

havia percentuais distintos nas concentrações protéicas entre as amostras cérebro e coração e essas com a cepa “C” do parasito. Para avaliar-se o reconhecimento de determinantes antigénicos do material estudado, procedeu-se o ensaio imunoenzimático “Western-Blotting” frente à soro hiperimmune de coelho e soro de cão positivo na IF e soros negativos, respectivamente, para *T. gondii*. As análises das fitas antigénicas, frente ao soro de coelho, revelaram reconhecimentos distintos entre as amostras de *T. gondii* isolado de *Gallus gallus domesticus* naturalmente infectado e dessas com a cepa “C”, embora o grupo compartilhe de cinco bandas anti-IgG para este hospedeiro (P30; P34, 7; P43; P67 e P80). Já frente ao soro de cão, observou-se o reconhecimento de dois determinantes antigénicos idênticos (P30 e P34,7) para as amostras de cérebro e coração. Esses e outros determinantes distintos foram reconhecidos nesse hospedeiro para a cepa “C”.

SUMMARY

In the present study, tachyzoites of *Toxoplasma gondii* isolated from naturally infected *Gallus gallus domesticus* brain and heart, from the urban area of Seropedica municipality, Rio de Janeiro State, and maintained in albino mice were studied and compared with the congenital strain, from IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Strains were subjected to electrophoresis SDS-polyacrylamide gel in order to evaluate possible protein variations in each strain. After the make-up of the gel, zymogram was stained by laser densitometry, where protein areas (concentration) in each strain were analysed. Protein outlines were distinct, even when compared to strain "C", showing intra-specific variations observed in the same host species. In the same way, analyzing zymograms, distinct percentages were observed in protein concentration between brain and heart strains and between these strains and parasite strain "C". Evaluating the recognition of studied material antigenic determinants, the enzyme immunoassay Western-blotting was applied to rabbit hyperimmune serum and

enzyme immunoassay Western-blotting was applied to rabbit hyperimmune serum and dog serum, both positives, at it and negative serum respectively. Antigenic strip analysis of the rabbit serum, revealed distinct recognitions between *T. gondii* strains isolated from naturally infected chicken and between these strains and strain "C", although the group shares five bands anti-IgG for this host (P30; P34,7; P43; P67 and P80). The recognition of two equal antigenic determinants (P30 and P34,7) in the dog serum for brain and heart strains was observed. These and other distinct determinants were recognized in this host for strain "C".

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii Nicolle & Manceaux, 1909, agente etiológico da toxoplasmose humana e animal, encontra-se em ampla variedade de espécies de aves e mamíferos, sendo distribuída em todo o mundo (FRENKEL, 1990). Como zoonose, a toxoplasmose está associada a infecções congênitas ou recorrentes, estas últimas especialmente, em indivíduos imunodeprimidos. Nos animais domésticos, tais como suínos, caprinos e ovinos, pode vir a acarretar prejuízos econômicos. As aves, potencialmente, têm sido consideradas como importantes sentinelas da ocorrência de toxoplasmose em ambientes peridomiciliares. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pelo *T. gondii* induz possivelmente a uma proteção imunitária contra a reinfecção; o que tem sido observado, principalmente, pela presença de antígenos taquizoíticos protetores, de superfície e citoplasmático

(SHARMA *et alii*, 1984; SIBLEY & SHARMA, 1987 e JOHNSON *et alii*, 1983). Os determinantes antigênicos do *T. gondii* incluem componentes moleculares, os quais são correlacionados à biologia celular do parasito, à indução da resposta imune, e aos estágios da doença; sendo que os antígenos de superfície de taquizoítas são de grande importância, pois além de caracterizarem a adesão, reconhecimento da célula hospedeira e invasão, representam a resposta imunológica primária do hospedeiro (KASPER *et alii*, 1983 e DECOSTER *et alii*, 1988). Essas moléculas, são atualmente usadas como poderosos marcadores na determinação da resposta imunitária, principalmente quando isoladas por imunoprecipitação com anticorpos monoclonais (KASPER *et alii*, 1983). No presente trabalho, caracterizaram-se os marcadores fenotípicos de amostras acistogênicas de *T. gondii* isolada a partir de coração e cérebro de galinha naturalmente infectada em relação a cepa “C”, isolada de um caso humano congênito.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

Toxoplasma gondii foi descrito pela primeira vez em 1908 por SPLENDORE em São Paulo, Brasil que o caracterizou como *Leishmania* o parasito encontrado em coelhos, baseando-se nas lesões observadas que se assemelhavam às do calazar humano. No mesmo ano, NICOLLE & MANCEAUX descreveram um parasito semelhante em roedores, gondi, em Matmata, Tunis, Tunísia. Da mesma maneira confundiram este parasito como sendo do gênero *Leishmania*, propondo nesta mesma nota o nome de *L. gondii*. Mais tarde, ao observar novos parasitos obtidos na mesma área e em roedores da mesma espécie, observaram não se tratar de *Leishmania*, pois não tinham cinetoplasto e nem se assemelhavam ao gênero *Haemogregarina* pela diferença na multiplicação e na capacidade de ser inoculado de um animal para outro. Desta maneira propuseram um novo nome para o parasito em questão como *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909.

A partir da descoberta deste parasito vários trabalhos foram relatados com base nas formas observadas nas vísceras dos animais, aos quais foram semelhantes às descritas previamente por NICOLLE & MANCEAUX (1909). Desta maneira várias espécies deste gênero foram registradas partindo da premissa que para cada hospedeiro vertebrado existiria uma nova espécie. Por conseguinte, SPLENDORE (1909) e CARINI (1909) propuseram para este parasito encontrado no coelho como *T. cuniculi*, para toupeiras como *T. talpae* (PROWAZEK, 1909), para cães como *T. canis* (MELLO, 1910) para pombo a denominação de *T. columbae* (MIGLIANO, 1913), para camundongos como *T. musculi* (SANGIORGI, 1913). Em 1914, CASTELLANI ao examinar um caso humano e encontrar o parasito denominou-o como *T. pyrogenes*.

A partir deste momento, passou-se a denominar como espécie nova a cada parasito encontrado, para cada vertebrado analisado. Porém, isto só teve seu fim, quando SABIN (1939) concluiu que as formas evolutivas do parasito encontradas, eram semelhantes; apesar do grande número de hospedeiros vertebrados, tinham o mesmo processo biológico e que não eram hospedeiros específicos e nem imunologicamente diferentes. Por isso, sugeriu que este parasito deveria pertencer a uma mesma espécie que, pela lei da prioridade, deveria chamar-se *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909.

HUTCHISON (1965) descobriu que *T. gondii* poderia ser eliminado nas fezes de gato, quando os mesmos tinham comido camundongos infectados. Apesar de se suspeitar que este parasito poderia ser transmitido por ovos de *Toxocara cati* (HUTCHISON, 1967). Esta colocação passou a ser considerada como circunstancial (SHEFIELD & MELTON, 1969; FRENKEL *et alii*, 1969) e a possibilidade de estar associada a um novo cisto (DUBEY *et alii*, 1970). Entretanto, a evidência de que a fase enteroepitelial do *T. gondii* estaria ligada à emissão de oocistos dispórico tetrazóicos nas fezes de gato só foi considerada consistente por FRENKEL *et alii* (1970) e DUBEY *et alii* (1970). A partir deste momento observou-se que *Isospora bigemina*, variedade minor, passaria a ser considerada, também, como oocistos de *T. gondii*. Com a eliminação de oocistos imaturos nas fezes (WALLACE, 1973) semelhantes aos oocistos do gênero *Isospora*, alguns autores tais como CORNELISSEN (1982) e BORST *et alii* (1984) têm sugerido a colocação do parasito neste gênero, muitas vezes denominando-o de *Isospora (Toxoplasma) gondii*. Finalmente, estes pequenos oocistos eliminados nas fezes de gatos não devem ser considerados de imediato como *T. gondii* na sua totalidade, já que também são semelhantes aos considerados para outros gêneros como *Besnoitia* e *Hammondia* com suas várias espécies (SMITH, 1981).

2.2. Classificação

Com base no complexo apical observado nos zoítas de *T. gondii*, descreveu-se o filo Apicomplexa, onde LEVNE *et alii* (1980), COX (1981) e SMITH (1981) classificaram-no como parte do:

Reino Protista Harckel, 1866, Subreino Protozoa Goldfuss, 1817, filo Apicomplexa Levine, 1970, Classe Sporozoa Leuckart, 1879; Subclasse Coccidia Leuckart, 1879; Ordem Eucoccidiida Léger & Dubosq, 1910; Subordem Eimeriina Léger, 1911; Família Sarcocystidae Poche, 1913; Subfamília Toxoplasmatinae Biocca, 1959 e gênero *Toxoplasma* Nicolle & Manceaux, 1909.

Desta subfamília também fazem parte três outros gêneros: *Besnoitia* Henry, 1913; *Hammondia* Frenkel & Dubey, 1975 e *Neospora canis* Dubey *et alii* (1988) Cuidados especiais devem ser tomados para não se confundir *T. gondii* com nenhuma das espécies dos gêneros acima citados, sejam a nível morfológico, biológico ou mesmo sorológico (LUNDE & JACOBS, 1965 e 1983; CHRISTIE & DUBEY, 1977; FRENKEL, 1977; WEILAND *et alii*, 1979; MEHLHORN & FRENKEL, 1980 e ARAÚJO *et alii*, 1984).

2.3. Morfologia

O *T. gondii* pode ser observado em vários tecidos de vertebrados (FRENKEL, 1972 e MILLER *et alii*, 1972) exceto nas hemácias de mamíferos; suas formas podem ser vistas, também, em líquidos orgânicos como saliva, leite e urina e transudato peritoneal. Ainda pode desenvolver toda as fases do seu ciclo biológico em células da mucosa intestinal (JEWELL *et alii*, 1972; DUBEY, 1986 e FRENKEL, 1986) sendo sua fase final, os oocistos, eliminados junto com as fezes.

Desta maneira, pode-se apresentar diferentes aspectos morfológicos dependendo da área e do estágio evolutivo (HIRT *et alii*, 1974 e AMATO NETO, 1982) , onde segundo FRENKEL (1973) as principais formas evolutivas na transmissão seriam: oocistos com seus esporozoítas, cistos com seus bradizoítas e os taquizoítas intra ou extracelulares.

2.3.1. Oocistos

Estes, como todo o coccídia da família Sarcocystidae, podem ser caracterizados como dispóricos tetrazóicos com oito formas infectantes, os esporozoítas. Até o presente momento só foram encontrados em fezes de felídeos. Os oocistos esporulados medem em média 10 x 12 µm de diâmetro (SOUZA, 1986).

Com auxílio da microscopia eletrônica, utilizando-se cortes ultrafinos, observaram-se características morfológicas que ajudaram na sua identificação. Ausência de organelas de locomoção e presença de um complexo apical em forma de cone achatado em sua extremidade afilada, denominado conóide (GUSTAFSON *et alii*, 1954; SHEFFILD & MELTON, 1968; HIRT *et alii*, 1974 e AMATO NETO *et alii*, 1982). Esta organela apresenta-se com três anéis, sendo o mais inferior caracterizado como anel polar, dando origem a 22 microtúbulos, provavelmente de natureza contrátil. Os quais se dirigem para a extremidade posterior do parasito. De acordo com SOUZA (1974), estas organelas podem conferir motilidade ao *T. gondii*.

No citoplasma observam-se as terminações das roptrias, que são consideradas como estruturas em forma de daga, além de túbulos mais delgados chamados de micronemas. Suspeita-se (DOROVAK & HOWE, 1979; NICHOLS & O'CONNOR, 1981; NICHOLS *et alii*, 1983 e CHIAPPINO *et alii*, 1984) que o conteúdo destas duas organelas seja eliminado durante a penetração do *T. gondii* na célula do hospedeiro.

2.3.2. Taquizoítas

São zoítas observados durante a forma aguda da infecção. De multiplicação rápida, porém, de sobrevivência rápida fora da célula. Anteriormente,

estas formas proliferativas quando encontradas dentro das células eram conhecidas como “pseudocistos”, trofozoítas ou mesmo endozoítas. Da mesma maneira que os esporozoítas, os taquizoítas apresentam-se em forma de meia lua, com uma extremidade afilada e outra arredondada. Estes medem aproximadamente de 4 a 8 μ m de comprimento por 2 a 4 μ m de largura. O núcleo localiza-se na porção central do citoplasma ou levemente recuado para a extremidade posterior. Quando corados pelo Giemsa, o citoplasma toma a tonalidade azul clara, enquanto que o núcleo cora-se em vermelho (SOUZA, 1986).

2.3.3. Bradizoítas

Formas encontradas em diversos órgãos em estrutura chamadas de cistos, têm sido observadas durante a fase crônica da infecção toxoplásmica, podem ser denominados, também, como cistozoítas. Multiplicam-se por endogenia. Os cistos acham-se localizados em diversos tecidos, sendo mais frequente encontrá-los em tecido de origem nervosa ou muscular. O tamanho dos cistos variaram, podendo chegar a 100 μ m de diâmetro (FRENKEL, 1973).

2.4. Biologia

De acordo com FRENKEL (1973) dois ciclos e cinco estágios do *T. gondii* formam o seu ciclo evolutivo. Um ciclo enteroepitelial, com estágios multiplicativos e semelhante ao que tem sido detectado em outros coccídios. Neste observam-se uma gametogonia, merogonia (=esquizogonia) e uma produção de oocistos com uma esporogonia. Dois outros estágios adicionais de localização extraintestinal no gato, podendo ser considerados como a forma que se tem observado, também, em outros vertebrados e caracterizados por taquizoítas em sua fase proliferativa, observados na fase aguda da infecção e os bradizoítas, dentro de parede cística demonstrados na fase crônica da infecção.

2.4.1. Ciclo enteroepitelial

Esta fase tem sido estudada no intestino de gatos jovens infectados com cistos provenientes de cérebro ou musculatura de camundongos. Apesar do aparecimento de *Cystoisospora felis* (= *I. felis*) ou *C. rivolta* (= *I. rivolta*) estes não interferem na produção de oocistos, das formas císticas ingeridas (FRENKEL, 1973). Da mesma maneira tal situação foi observada anteriormente por PIERKARSKI & WITTE (1971) em relação aos parasitos mencionados

anteriormente. Se os felinos forem alimentados com cistos de *T. gondii*, o período prepatente variou entre três a cinco dias. Diversos tipos de merozoítas foram observados, variando de tipo A ao D, seguido por uma gametogonia que tem ocorrido com maior frequência no intestino delgado, principalmente no íleo dos felinos. A esporulação tem ocorrido no meio exterior num período de um a cinco dias, dependendo da temperatura, da umidade e da quantidade de oxigênio do meio (DUBEY *et alii*, 1970a,b). Dois esporocistos são formados no interior do oocisto e, em cada um contendo quatro esporozoítas.

2.4.2. Ciclo extraintestinal

Este pode ocorrer não só em gatos, como tem sido o mais comum desenvolvimento em outros vertebrados, seja pela ingestão de oocistos por contaminação, pela ingestão de cistos através do carnivorismo e canibalismo, ou mesmo, durante a fase aguda da infecção toxoplásmica os taquizoítas circulantes, através da placenta atingem o embrião ou feto.

Após a ingestão dos oocistos ou cistos, cuja liberação dos zoítas se processa por intermédio de digestão, estes tendem a ultrapassar a barreira intestinal, ganhando a circulação de retomo, penetram em diversas células viscerais, multiplicando-se rapidamente por endogenia, dando origem a milhares de

taquizoítas na fase aguda da infecção. A seguir, quando a infecção vai se tornando crônica, estes taquizoítas invadem novas células, dividindo-se, agora, lentamente por endogenia e dão origem a formação do cisto. Estas fases também podem ser vistas nos próprios felídeos, ou seja, a formação dos taquizoítas e dos bradizoítas, respectivamente.

2.4.3. Outras considerações

O desenvolvimento biológico do *T. gondii* pode ser observado em taquizoítas eliminados na saliva (JAMRA *et alii*, 1971 e AMENDOEIRA & COUTINHO, 1982) e no leite (CHIARI & NEVES, 1984). Os hospedeiros de transporte como baratas, moscas e minhocas podem estar envolvidos na cadeia epidemiológica deste protozoário (WALLACE, 1973 e RUIZ & FRENKEL, 1980), onde se pode dar a veiculação do parasito (oocistos) de um local para o outro (FRENICEL, 1972 e HUGHES, 1985).

2.5. Avaliação e caracterização do *Toxoplasma gondii*

Apesar de existirem variações morfológicas e antigénicas, entre os estágios do ciclo evolutivo deste parasito, principalmente nas suas formas

invasivas, tais como os bradizoítas nos cistos, os taquizoítas sistêmicos e os esporozoítas dos oocistos (DUBEY *et alii*, 1970; FRENKEL *et alii*, 1970; NAOT *et alii*, 1983; KASPER *et alii*, 1984 e KASPER & WARE, 1985), muitas amostras de *T. gondii* tem sido isoladas em diferentes hospedeiros, embora com morfologia semelhantes, tem-se observado variações a nível biológico, sorológico e imunológico (WARE & KASPER, 1987; VERHOFSTEDE *et alii*, 1988; CHARIF *et alii*, 1990), entre outras.

Assim, em decorrência da inespecificidade de parasitismo, a caracterização deste protozoário deve ser feita tomando-se o cuidado de não confundi-lo com outros coccídios, como por exemplo *N. canis*, que apresenta morfologia semelhante (DUBEY & LINDSAY, 1993) e, segundo BJERKÂS *et alii*. (1994), compartilham moléculas antigênicas (P17, P29 e P30) de mesma origem e peso molecular do *T. gondii*.

2.5.1. Identificação fenotípica.

Na maioria das vezes as amostras de *T. gondii* foram caracterizadas por seu efeito sobre o hospedeiro, sendo desta maneira evidenciadas como mais ou menos virulentas para camundongos (KAUFMAN *et alii*, 1968). Assim, observou-se que cepas acistogênicas eram mais virulentas do que as cistogênicas,

considerações estas observadas por KASPER *et alii* (1982) na cepa “RH” acistogênica que era desprovida da maior proteína de membrana a P22. Outras amostras menos virulentas do *T. gondii* foram estudadas quanto a detecção e caracterização dos antígenos de superfície de membrana, resposta humoral de camundongos a diversas cepas mais ou menos virulentas ou mesmo na identificação diferencial com outros coccídios da subfamília Toxoplasmatinae (SUGGS *et alii*, 1968; HANDMAN & REMINGTON, 1980 e HANDMAN *et alii*, 1980).

Diferenças de perfis antigênicos de *T. gondii* têm sido descritas para cepas isoladas em vários hospedeiros, como também de amostras infra-específicas (BLOONFIELD & REMINGTON, 1970; FRENKEL, 1990; SIBLEY & BOOTHREYD, 1992); sendo que alguns desses isolamentos terem sido considerados pouco patogênicos para seu hospedeiro natural, como foi observado em aves no Brasil, por PEIXOTO (1990).

Embora a virulência das amostras seja caracterizada pelo seu efeito sobre camundongos (KAUFMAN *et alii*, 1958), a caracterização antigênica tem sido melhor identificada pelo perfil eletroforético (BLOONFIELD & REMINGTON, 1970; CHARIF *et alii*, 1990). As variações nas concentrações de proteínas vêm corroborar com as características de virulência e antigenicidade das amostras de *T. gondii* (SANTORO *et alii*, 1985) analisadas.

2.5.2. “Western blotting”

Além de observar com maior acuidade a resposta imune no início ou no final do período de infecção do *T. gondii* (VERHOFSTEDE *et alii*, 1988), o imunoblotting tem sido usado na caracterização antigênica deste mesmo parasito à anticorpos circulantes, no caso as imunoglobulinas G (IgG) dos hospedeiros vertebrados (HANDMAN *et alii*, 1980; JOHNSON *et alii*, 1983 e PARTANEN *et alii*, 1983).

NAOT *et alii* (1993), verificaram que anticorpos da classe IgG respondem a carboidratos e proteínas de taquizoítas, responsáveis pela invasão à célula do hospedeiro. Desta maneira, a invasão está associada a muitas proteínas de superfície da membrana do taquizoíta, que são considerados como sendo responsáveis pela fase aguda da toxoplasmose; enquanto a fase crônica tem sido caracterizada, principalmente, por antígenos excretados / secretados, presentes no citosol, sendo identificados como antígenos imunoprotetores (NAOT *et alii*, 1983; WARE & KASPER, 1987 e CHARIF *et alii*, 1990).

CAMARGO *et alii* (1978) e MINEO *et alii* (1980), observaram reação entre polissacarídeo excretado de *T. gondii*, com anticorpos de indivíduos; detectaram que os anticorpos IgM reagem com polissacarídeo e proteínas de sobrenadante obtidos por centrifugação e sonicação de taquizoítos, por outro lado, anticorpos IgG, reagem preferencialmente com preparados contendo proteínas e bem menos com

polissacarídeos. Estes autores sugerem que anticorpos IgM são evidenciados na resposta para moléculas de um complexo glicoprotéico, enquanto os anticorpos da classe IgG reconhecem preferentemente os componentes protéicos deste parasito.

HUYHES & BALBOUR (1981), reportaram que 11 determinantes antigênicos em soro de indivíduos com toxoplasmose, são reconhecidos em preparações de antígenos solúveis de taquizoítas. Segundo os mesmos autores, nove dessas moléculas são de natureza protéica, uma um lipolissacarídeo e outra uma glicoproteína.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedência dos animais

3.1.1. Procedência das aves

Um total de onze (11) galinhas (*Gallus gallus domesticus*) mantidas em condições naturais, em diversas propriedades na área urbana do Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, foram utilizadas na obtenção de formas parasitárias de *T. gondii*.

3.1.2. Procedência dos camundongos albinos

Utilizaram-se cem camundongos albinos fêmeas pesando em média 20 ± 2 g, procedentes do Biotério do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Estado do Rio de Janeiro. Porém, os trabalhos de isolamento e caracterização morfológica do *T. gondii* em camundongos,

trabalhos de isolamento e caracterização morfológica do *T. gondii* em camundongos, foram realizados no Setor de Imunologia do Projeto Sanidade Animal (EMBRAPA/UFRRJ) no Km-7 da BR-465, Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

3.2. Isolamento do *Toxoplasma gondii* de galinhas naturalmente infectadas.

Após a necrópsia, foram coletados fragmentos de cérebro e coração das aves, triturados com auxílio de um gral e pistilo estéreis; a seguir homogeneizados em 10 ml de solução salina a 0,9% e filtrados através de gaze estéril com quatro camadas. À suspensão proveniente do cérebro (amostra cérebro) e, àquela do coração (amostra coração) foram adicionados 100 UI de penicilina G potássica em 100µg de estreptomicina.

3.3. Obtenção de *Toxoplasma gondii* amostra congênita.

Para efeito de comparação, utilizou-se a cepa congênita (“C”) de *T. gondii*, proveniente do Departamento de Protozoologia do IOC (FIOCRUZ), mantidas através inoculações em camundongos albinos.

3.4. Análise dos taquizoítas mantidos em camundongos albinos

3.4.1 Comportamento dos taquizoítas em macrófagos

Com a finalidade de avaliar a invasividade das formas parasitárias à macrófagos peritoneais, procedeu-se a coleta de esudato dos camundongos inoculados com as respectivas amostras. Preparou-se esfregaços destes exsudatos em lâmina, fixados pelo metanol por três minutos e corou-se pelo Giemsa na proporção de três gotas para 1,0 ml de solução tampão pH 7,2. Posteriormente os esfregaços foram submetidos à microscopia óptica, na proporção do número de macrófagos peritoneais parasitados por 100 macrófagos avaliados.

3.4.2 Mensuração e fotografia

As medidas dos taquizoítas obtidos das passagens das amostras do coração e cérebro de galinha, naturalmente infectada, assim como as da cepa “C” foram feitas com auxílio de microscópio óptico Dialux-Leiz 20-EB (República Federal da Alemanha), com ocular micrométrica K-15 PZO (República da Polônia). As fotografias foram feitas em microscópio triocular Jenapol, com equipamento

modelo mf-AKS 24x36/automatic-2 (República Federal da Alemanha) e , com filme Kodak 135 mm, 100 ISO.ZO.

3.4.3 Análise estatística

A análise estatística utilizada neste trabalho foi feita pelo programa MINITAB (SCHAEFER & ANDERSON, 1989).

3.5. Obtenção dos taquizoítos.

Para obtenção de massa antigênica, 10^6 taquizoítos em 0,5 ml de exsudato peritoneal, de cada amostra (cérebro e coração) e da cepa “C,” foram inoculados por via intraperitoneal em 25 camundongos albinos, perfazendo um total de 75 animais. Os animais utilizados foram mantidos no infectório do Laboratório de Imunologia do Projeto Sanidade Animal, EMBRAPA - UFRRJ, onde receberam ração (Labina®, Purina) e água *ad libitum*.

3.6. Purificação do antígeno.

A partir de amostras da 56ª passagem, o exsudato obtido de cada lote, foi submetido ao método de centrifugação diferencial (LYCKE & LUND, 1964),

para separação das formas parasitárias de outros constituintes do exsudato peritoneal (leucócitos e hemácias).

Utilizando-se tubos siliconizados de 50 ml, centrifugou-se o volume obtido de exsudato, em centrifuga refrigerada (DPR - 6000 Centrifuge, Damond/IEC) a 65G por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 440G por 20 minutos à 4°C. O “pellet” foi ressuspenso, ao volume inicial, em PBS pH 7,2 e centrifugado a 260G por 10 minutos à 4°C. Esse novo sobrenadante foi centrifugado a 440G por 20 minutos à 4°C. O “pellet” final foi ressuspenso, ao volume inicial em PBS pH 7,2.

O produto dessa centrifugação foi submetido ao exame de microscopia óptica, para confirmar a pureza da suspensão de taquizoítas livres. Procedeu-se contagem dessas formas parasitárias, de cada lote, em câmara de Newbawer obtendo-se $1,6 \times 10^8$ taquizoítas na amostra cérebro, $1,5 \times 10^8$ na amostra “coração” e, $2,1 \times 10^8$ na cepa congênita por ml.

3.7. Sonicação e dosagem de proteínas.

A suspensão de células foi submetida à sonicação, em banho de gelo em um sonicador (Sonic Dimembrator - Model 300, Fisher), a 60 Hertz, em intervalos de 5 minutos por 30 minutos. Após a sonicação o material foi submetido

ao exame de microscopia óptica para certificar se havia o rompimento total dos taquizoítos.

Submeteu-se o preparado à dosagem de proteínas utilizando-se o método de Folin & Lowry (LOWRY *et alii*, 1951), obtendo-se a concentração proteica antigênica de 2,64 mg/ml da amostra “cérebro”, 1,05 mg/ml da amostra “coração” e, 2,22 mg/ml da cepa “C” (Apêndice 01). O material foi dividido em alíquotas de 2,0 ml em tubos tipo eppendorf e estocado em freezer a -20°C.

3.8. Eletroforese em gel de SDS - poliacrilamida

As amostras antigênicas do *T. gondii* foram submetidos ao tratamento em tampão para eletroforese a saber: DTT (Dithiothreitol), SDS (Dodecil sulfato de sódio), Tris HCl, glicerol, BFB (Azul de bromo fenol) e em seguida desnaturado a 100°C por 3 minutos.

A eletroforese em sistema descontínuo (ANDREWS, 1981), foi realizada em gel de SDS - poliacrilamida a 10% (SDS - PAGE) com proporção acrilamida - bis acrilamida 30:1; utilizou-se cuba Mini protean II (Bio Rad Laboratories), fonte 2297 Macrodrives 5 constant power suply (LKB Bromma) e unidade de refrigeração 2219 Multitemp II Thermostatic Circulater (LKB Broma).

Utilizou-se 200 µl (210 µg) de antígeno sonificado total de taquizoítas de *T. gondii*, para cada amostra, em gel contínuo. A eletroforese foi realizada a 80

Volts, 25 mA e 15 Watts a 4°C, para o empilhamento da amostra; posteriormente a corrida foi realizada a 100 V, 25 mA, 15 W a 4°C por uma hora e 40 minutos, para separação das proteínas. Após a corrida, o gel foi fixado em solução de metanol a 50% por 30 minutos à temperatura ambiente. Corado pelo azul brilhante de Comassie 250R (Bio Rad Laboratories) por 30 minutos à temperatura ambiente. Descorado com solução ácido acético - metanol até a total revelação dos zimogramas. Seco em solução de ácido acético - metanol - formaldeído por 30 minutos à temperatura ambiente e, montado em papel celofane poroso (LKB Bromma), para posterior análise dos zimogramas.

As proteínas foram analisadas conforme mobilidade relativa no zimograma, tendo como parâmetro a curva de calibração de um padrão de peso molecular (Sigma Chemical) contendo alfa - lactoalbumina (14,2 Kd), tripsinogênio (24 Kd), anidrase carbônica (29 Kd), gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (36 Kd), ovoalbumina (45 Kd), soro albumina bovina (66 Kd) e fosforilase b (97,4 Kd) (Apêndice 02).

3.9. Densitometria

Após a montagem dos géis, integrou-se os zimogramas por densitometria a laser, utilizando-se um densitômetro (2202 Ultrosan laser densitometer, LKB Bromma) acoplado a um registrador de picos (Integrator 3396 série II, Hawlt Packard),

a fim de analisar-se as bandas de proteínas e suas respectivas áreas (concentrações), para cada amostra. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia - EMBRAPA, Seropédica, Rio de Janeiro.

3.10. Ensaio Imunoenzimático “Western blotting”.

Procedeu-se o ensaio imunoenzimático “Western blotting” (BLAKE *et alii*, 1984), para avaliar-se o reconhecimento antigênico das amostras (cérebro e coração) e da cepa “C” frente a soro de coelho imunizado com antígeno de *T. gondii*, cepa congênita, título de 1:1024 na imunofluorescência indireta (IF), com seu respectivo controle negativo, cedidos gentilmente pelo Dr. Wilson Jacinto Silva de Souza, Departamento de Protozoologia do IOC. Assim como, frente a soro de cão inoculado com taquizoítas de *T. gondii*, cepa “C”, com título de 1:4096 na IF, com seu respectivo controle negativo, proveniente do Laboratório de Imunologia do Projeto Sanidade Animal EMBRAPA/UFRRJ.

Procedeu-se a eletroforese, como descrita no item anterior; realizou-se a transferência das proteínas para papel de nitrocelulose (GIBCO BRL, Life Technologies), utilizando-se o sistema Mini Trans Blot (Bio Rad Laboratories). Realizou-se a transferência a 30V, 25mA e 15W, “over-night” a 4°C. Após a transferência, o papel foi cortado em fitas verticais de 5 mm, obtendo-se 12,35 µg de antígeno por fita, que foram lavadas em água destilada.

Uma fita de cada amostra transferida, foi corada em solução de ouro coloidal a 50% (Bio Rad Laboratories), para certificar-se a presença do antígeno.

As fitas foram bloqueadas com TBS Tween 20 a 0,1% e leite desnatado seco a 5% pH 7,4 por uma hora, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após o bloqueio, lavaram-se as fitas por 5 vezes consecutivas com TBS Tween 20 a 0,1% pH 7,4. Incubaram-se os soros testes, diluídos a 1:400 em TBS Tween 20 a 0,1% e leite desnatado seco a 3% pH 7,4, por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação constante. Repetiu-se o procedimento de lavagem e, incubou-se com o conjugado: soro de cabra anti-IgG de coelho, conjugado à fosfatase alcalina (Sigma Chemical), soro de coelho anti-IgG de cão, conjugado a fosfatase alcalina (Sigma Chemical), para seus respectivos soros testes; diluídos a 1:1000 em TBS Tween 20 a 0,1% e leite desnatado seco a 3% pH 7,4, por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após a lavagem, adicionou-se o substrato constituído de 1 ml de N,N dimetilformamida a 70% (DMF) com 33 mg de nitroazul de tetrazolio clorídrico (NBT) e 1 ml de DMF com 16,5 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indol fostato (BCIP), misturado a 100 ml de tampão Tris-cloreto de magnésio pH 9,5. Com a revelação do ensaio, interrompeu-se a reação pela adição de água destilada.

Posteriormente, as fitas foram secas em papel de filtro e organizadas para análise e fotografias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da capacidade invasiva dos taquizoítas a macrófagos peritoneais.

A avaliação dos macrófagos peritoneais parasitados, para cada grupo de animais infectados, revelou uma nítida diferença entre as amostras de *T. gondii*, provenientes de *G. gallus domesticus* naturalmente infectado, comparado à cepa congênita.

Para a amostra cérebro foi observado um percentual de invasão de 34% e, para amostra coração de 33%, enquanto os macrófagos peritoneais dos camundongos inoculados com a cepa congênita tiveram 100% de invasão (Figura 1).

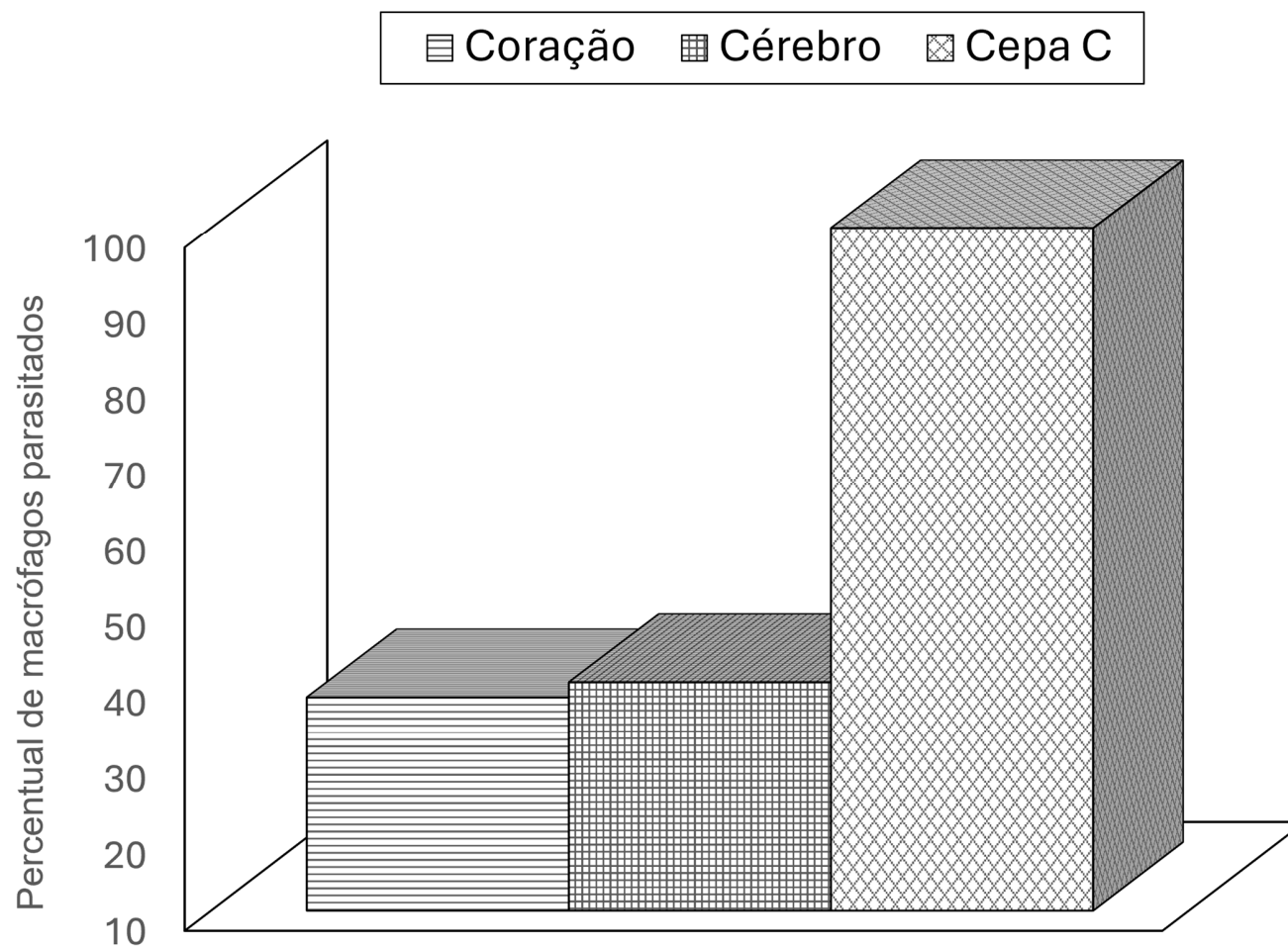


Figura 01. Variação de macrófagos parasitados por *Toxoplasma gondii*, em lavado peritoneal de camundongos albinos.

Da mesma maneira, observou-se a diferença dos taquizoítas removidos do lavado peritoneal ,onde os isolados ,da cepa “C”, foram significativamente diferentes ao serem comparados com as amostras cérebro e coração, porém diferenças ainda puderam ser observadas a nível de diâmetro maior entre as amostras de cérebro e coração (Tabela 1) e (Figura 2).

A invasão dos taquizoítas de *T. gondii* está associada à adaptação destas formas parasitárias às células do hospedeiro. Assim como, o poder de invasão está diretamente correlacionado às proteínas de membrana, presentes nestes (NAOT *et alii*, 1983; WARE & KASPER, 1987 e CHARIF *et alii*, 1990). Assim, a diferença no percentual de invasão aos macrófagos peritoneais, ora observado, pode ser justificada por possíveis variações de proteínas de superfície de membrana, de cada amostra analisada, assim como as concentrações destas moléculas.

Tabela 1. Aspectos comparativos dos zoítas de *Toxoplasma gondii*, obtidos de lavado peritoneal de camundongos albinos.

MEDIDAS	ZOÍTAS (um) ^a		
	Cérebro	Coração	Congênita
Diâmetro maior	5,72 ± 0,59 ^b	5,98 ± 0,43 ^b	7,05 ± 0,78 ^b
Diâmetro menor	2,20 ± 0,32 ^c	2,20 ± 0,29 ^c	2,65 ± 0,24 ^b

^a Número de amostras = 10

^b P<0,001

^c N.S.

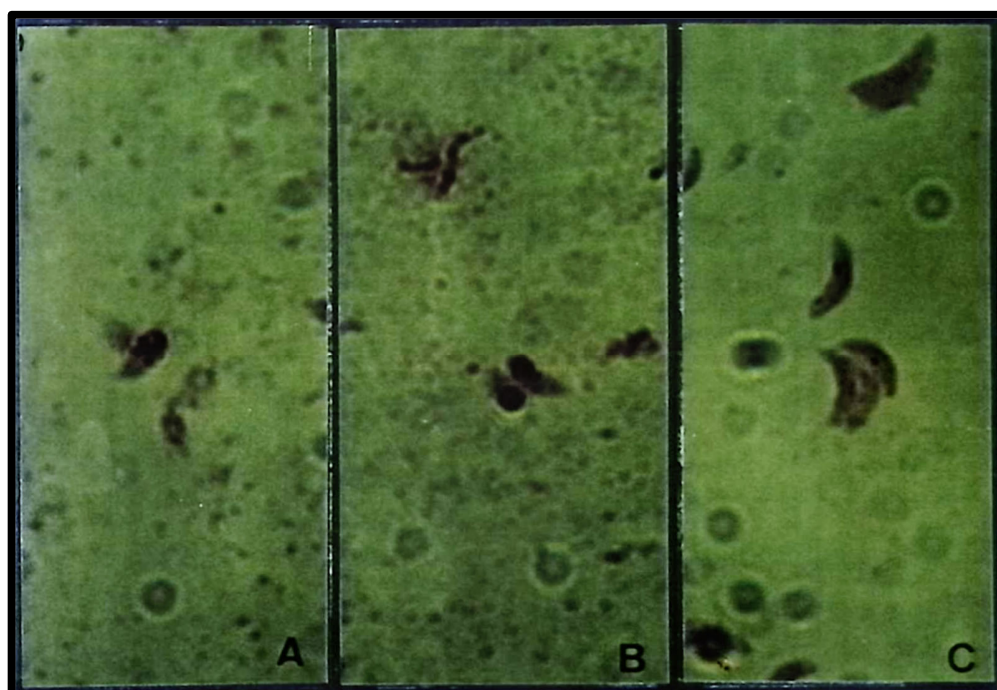


FIGURA 2. Lavado peritoneal de camundongos albinos: taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. Amostras de coração (A), cérebro (B) e cepa "C" (C). Giemsa (— = 10 μ m).

4.2. Aspectos comparativos do perfil eletroforético das amostras cérebro e coração e da cepa “C”.

A fim de caracterizar os perfis proteicos dos grupos de *T. gondii* estudado, procedeu-se a eletroforese em gel de SDS - poliacrilamida (SDS PAGE), em sistema descontínuo, por esse apresentar melhores resoluções do zimograma (SARGENT & GEORGE, 1975).

Este método tem sido amplamente utilizado para diferenciar vários grupos de microrganismos, entre eles: vírus, bactérias, fungos e protozoários (ANDREWS, 1981). A caracterização fenotípica e genotípica do *T. gondii* têm sido amplamente estudadas através da eletroforese, como também a expressão desse parasita no sistema hospedeiro (BLOOMFIELD & REMINGTON, 1970; SIBLEY & BOOTHROYD, 1992 e GUO & JOHNSON, 1995).

Muitas amostras de *T. gondii* têm sido isoladas em diferentes hospedeiros, embora com morfologia semelhante, tem-se observado variações a nível biológico, sorológico e imunológico (WARE & KASPER, 1987; VERHOFSTEDE *et alii*, 1988 e CHARIF *et alii*, 1990). Além da inespecificidade de parasitismo, a caracterização deste protozoário deve ser feita tomando-se o cuidado de não o confundir com outros coccídios, como *Neospora caninum*, que apresenta morfologia semelhante e algumas moléculas antigênicas (P17, P29 e P30) de mesma origem e peso molecular do *T. gondii* (BJERKÅS *et alii*, 1994).

A análise eletroforética no presente estudo revelou que o perfil dos extratos antigênicos de taquizoítas das amostras cérebro e coração e, da cepa “C” diferem entre si (Tabela 2), embora o grupo analisado compartilhe identicamente oito moléculas (P30; 34,7; 43; 50; 58; 67; 80 e P97). Esses dados revelam que existe uma diferença de variação intraespecífica entre as amostras isoladas de *G. gallus domesticus*, assim como essas e a cepa “C” (Figura 3).

Diferenças de perfis antigênicos de *T. gondii* têm sido descritas para cepas isoladas em vários hospedeiros, como também de amostras infra-específicas (BLOONFILD & REMINGTON, 1970; FRENKEL, 1990 e SIBLEY & BOOTHREYD, 1992); sendo algumas dessas amostras pouco patogênicas para seu hospedeiro natural, como foi observado por PEIXOTO (1990) em aves, procedentes da mesma região de origem do material deste trabalho.

A virulência das amostras tem sido caracterizada pelo seu efeito sobre camundongos (KAUFMAN *et alii*, 1958); entretanto a caracterização antigênica é melhor identificada pelo perfil eletroforético (BLOONFILD & REMINGTON, 1970 e CHARIF *et alii*, 1990).

Tabela 2- Perfil protéico do extrato antigênico de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* das amostras cérebro, coração e congênita.

PERFIL*		
CORAÇÃO	CÉREBRO	CONGÊNITA 7,0
--	--	7,0
8,0	--	8,0
20,0	--	--
23,0	--	23,0
25,0	--	--
30,0	30,0	30,0
34,7	34,7	34,7
43,0	43,0	43,0
50,0	50,0	50,0
58,0	58,0	58,0
67,0	67,0	67,0
80,0	80,0	80,0
--	94,0	--
97,0	97,0	97,0
--	101,0	--

* PM(Kd) = Peso molecular aproximado em kilodaltons

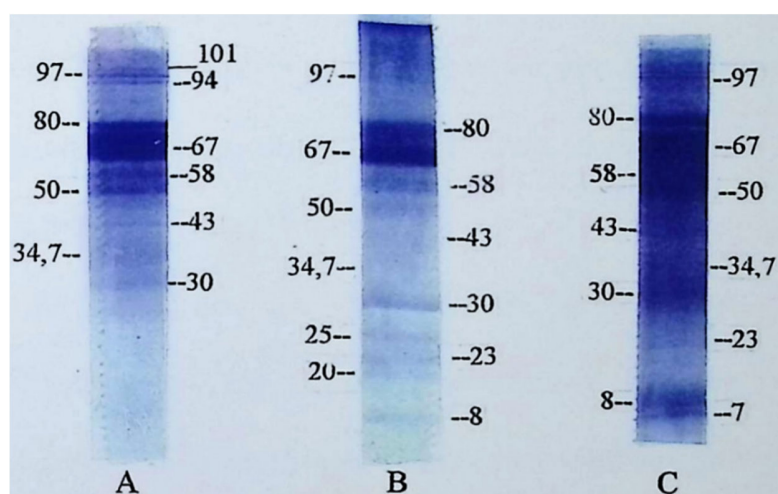


FIGURA 3. Perfil Protéico (Peso Molecular, Kd) das Amostras: Cérebro (A), Coração (B) e Cepa Congênita (C), através de SDS-PAGE.

4.3. Avaliação das concentrações de proteínas do material estudado.

A análise das bandas de proteína nos zimogramas foram realizadas por densitometria a laser, a fim de certificar se o grau de pureza dos extratos antigênicos de *T. gondii* e as respectivas concentrações das bandas (ANDREWS, 1981).

Pela densitometria pode-se observar que as proteínas reveladas no gel de SDS - poliacrilamida, mostraram-se sensíveis, apresentando picos compatíveis com a eletroforese (Figuras 4, 5 e 6).

A verificação da concentração protéica de cada banda dos zimogramas, integrados em áreas, mostraram-se distintas; estas diferenças apresentadas, podem ser consideradas pertinentes, uma vez que, partiu-se da mesma concentração de proteína para cada preparação de *T. gondii* estudada. Comparando-se as proteínas compartilhadas entre as amostras de *T. gondii* utilizadas, pode-se verificar significantes diferenças entre as concentrações de cada molécula (Tabelai). Essas variações podem estar associadas à virulência do *T. gondii* para camundongos albinos, submetidos à infecção (KAUFMAN *et alii*, 1958).

Por outro lado, KASPER *et alii* , 1982 observaram que as cepas virulentas sejam cistogênicas, ou não, são genotipicamente idênticas (SIBLEY & BOOTHROYD, 1992).

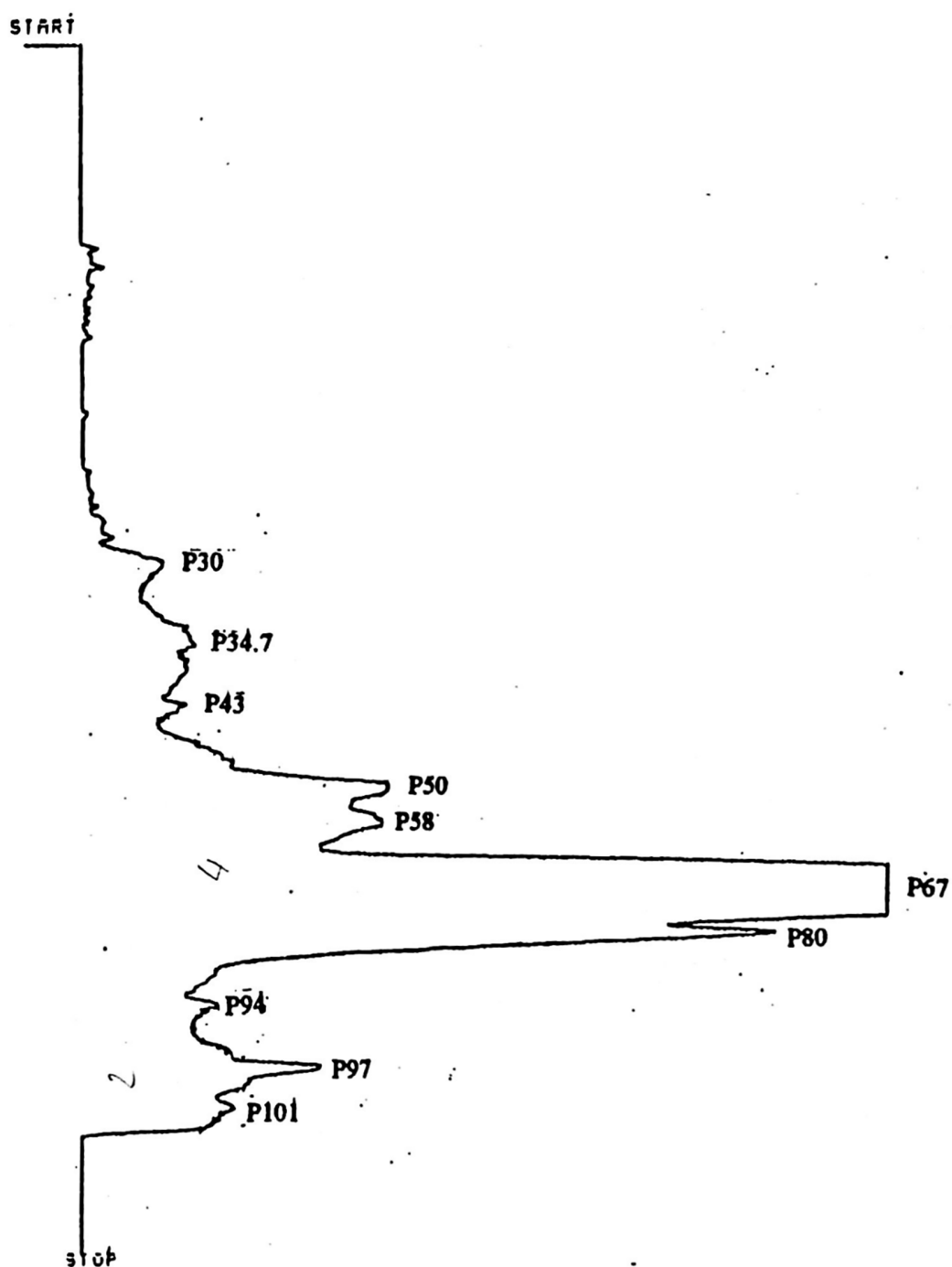


Figura 04. Análise de Proteínas (Concentração): Área Integrada por Densitometria, da Amostra “Cérebro” de Taquizoítos de *T. gondii* Isolados de *G. gallus* naturalmente Infectado.

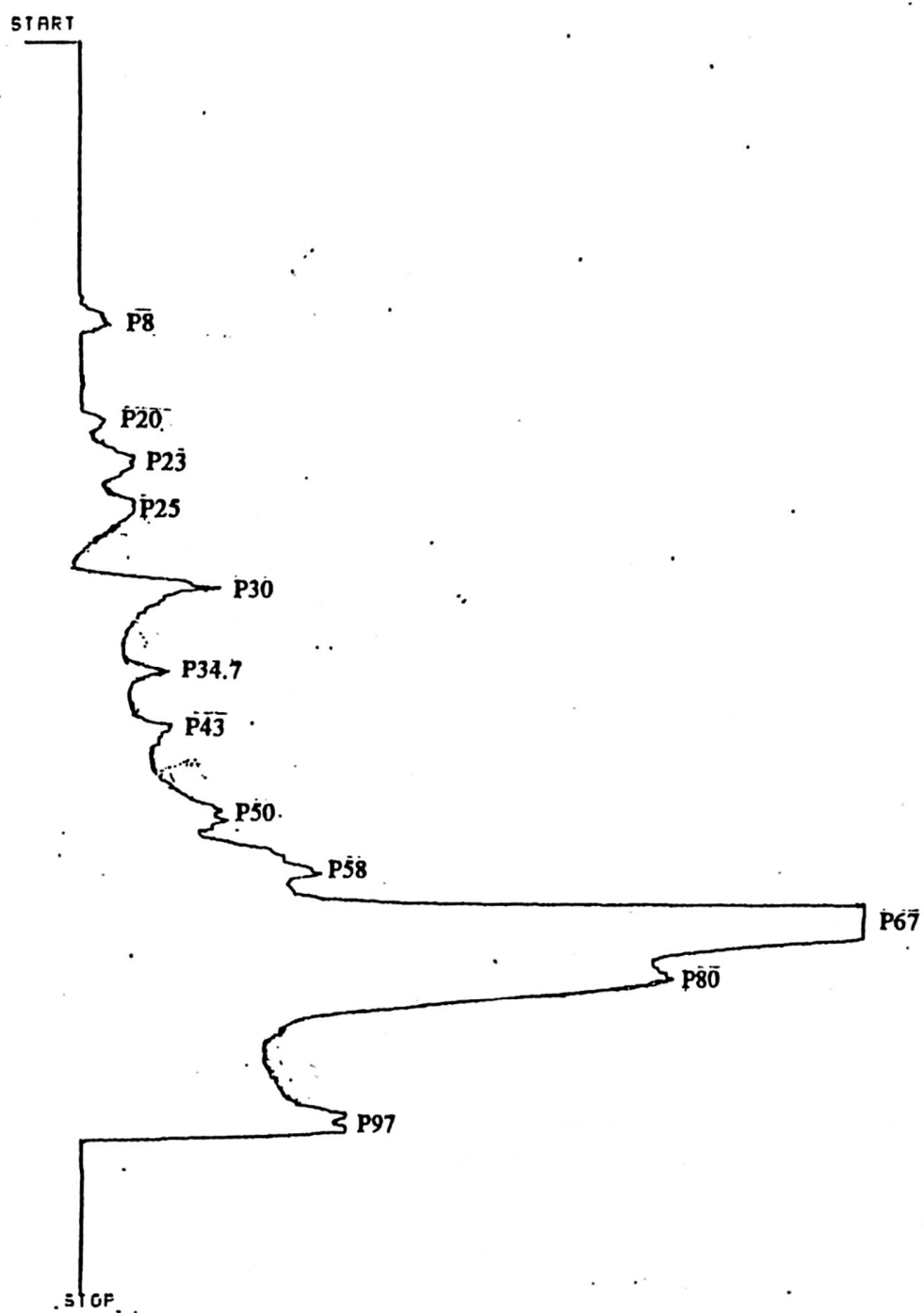


Figura 05 . Análise de Proteínas (Concentração); Área Integrada por Densitometria, da Amostra “Coração” de Taquizoítos de *T. gondii* Isolados de *G. gallus* naturalmente Infectado.

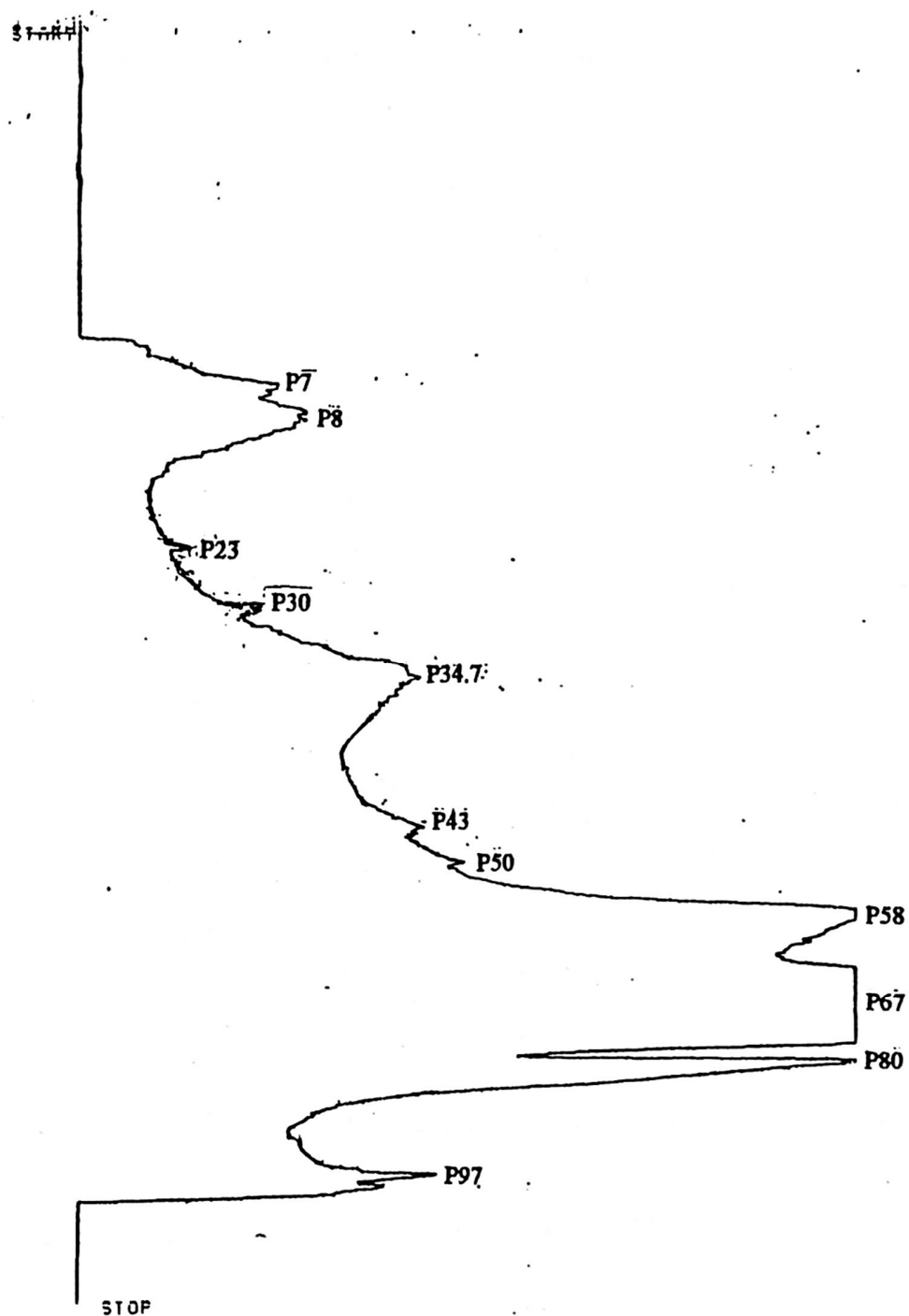


Figura 06 . Análise de Proteínas (Concentração): Área Integrada por Densitometria, da Cepa "C" , Taquizoítos.

Tabela 03- Concentrações proteicas das bandas nos zimogramas dos extratos de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* analisados.

ZIMOGRAMAS					
CORAÇÃO BANDAS*	%	CÉREBRO BANDAS*	%	CONGÊNITA BANDAS*	%
--	--	--	--	7,0	1,82
8,0	0,35	--	--	8,0	3,92
20,0	0,27	--	--		--
23,0	1,18	--	--	23,0	2,14
25,0	--	--	1,73	--	--
30,0	3,04	30,0	2,08	30,0	0,66
34,7	1,50	34,7	5,33	34,7	14,44
43,0	3,05	43,0	1,17	43,0	1,99
50,0	5,92	50,0	9,16	50,0	3,88
58,0	6,82	58,0	6,01	58,0	17,48
67,0	67,76	67,0	66,63	67,0	36,01
80,0	2,88	80,0	1,86	80,0	7,79
--	--	94,0	0,43	--	--
97,0	5,23	97,0	4,54	97,0	2,93
--	--	101,0	2,51	--	--

*PM (Kd) = Peso molecular aproximado em kilodaltons.

Nesse estudo o material analisado é proveniente de *T. gondii* acistogênico, embora KASPER *et alii*, 1982 tenha observado que a cepa “RH” acistogênica era desprovida de proteína de membrana como a P22, porém no presente estudo constatou-se que algumas proteínas de superfície de membrana, como a P30 e P34,7, estavam presentes em todo material analisado e outras na amostra coração (Tabela2).

Existe ainda uma variação na concentração de proteínas de *T. gondii* em diferentes cepas, como por exemplo, a molécula P30 que foi referenciada por SANTORO *et alii* (1985), com participação no total de proteínas contidas em extrato antigênico de *T. gondii* variando de 3 - S%, contrariando o observado neste estudo, onde essa molécula teve valores abaixo do observado por esses autores. (TAB. 3).

4.4. “Western blotting” das amostras cérebro e coração e da cepa congênita frente a soro hiperimune de coelho e soro de cão.

Para avaliar o reconhecimento de determinantes antigênicos do material estudado, procedeu-se o ensaio imunoenzimático “Western blotting” (BLAKE *et alii*, 1984), frente a soro hiperimune de coelho e soro de cão positivos na IF, e soros negativos, respectivamente, para *T. gondii*.

As análises das fitas antigênicas, frente ao soro de coelho, revelaram reconhecimentos distintos entre as amostras de *T. gondii*, isoladas de *G. gallus* naturalmente infectado, e dessas com a cepa “C”. Embora o grupo compartilhe de cinco bandas anti-IgG para este hospedeiro (P30; 34,7; 43; 67 e P80).

Já frente ao soro de cão, observou-se o reconhecimento de dois determinantes antigênicos idênticos (P30 e P34,7), para as amostras cérebro e coração e, esses e outros determinantes distintos foram reconhecidos nesse hospedeiro para a cepa congênita. Deve-se levar em consideração que o soro obtido de cão não era hiperimune; desta maneira, foi difícil a utilização dos dados em termos comparativos. Verificou-se assim, uma diferença de comportamento imunológico entre os extratos antigênicos de taquizoítas de *T. gondii*, distintos, e os dois sistemas hospedeiro aqui utilizados (Figuras 7, 8 e 9) Quando a cepa “C” foi comparada com as outras três diferentes amostras de *T. gondii*, a primeira apresentou-se com resultados sorológicos na IF-IgG humana, melhores do que as últimas (FISMAN & COUTINHO, 1980).

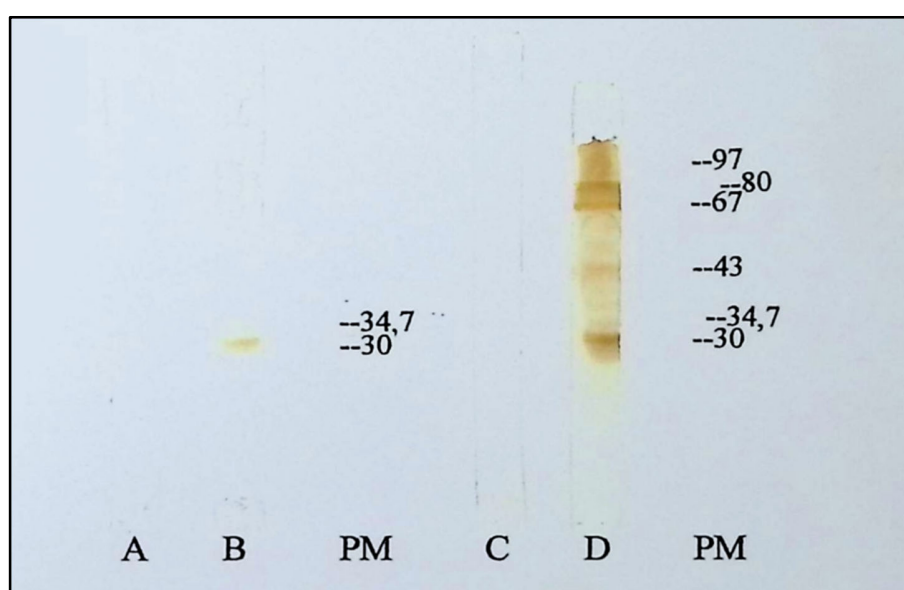


Figura 7- Western Blotting de *Toxoplasma gondii*, amostra cérebro frente a soro de coelho e cão: Cão negativo (A), cão positivo (B), coelho negativo (C), coelho positivo (D) e peso molecular (PM).

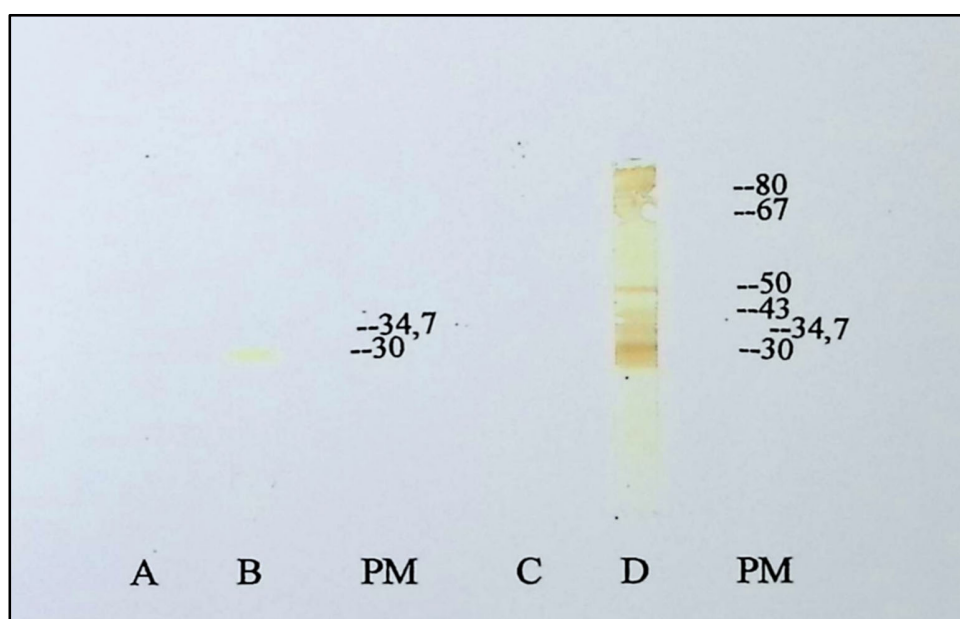


Figura 8- Western Blotting de *Toxoplasma gondii*, amostra coração, frente a soro de coelho e cão: Cão negativo (A), cão positivo (B), coelho negativo (C), coelho positivo (D) e peso molecular (PM).

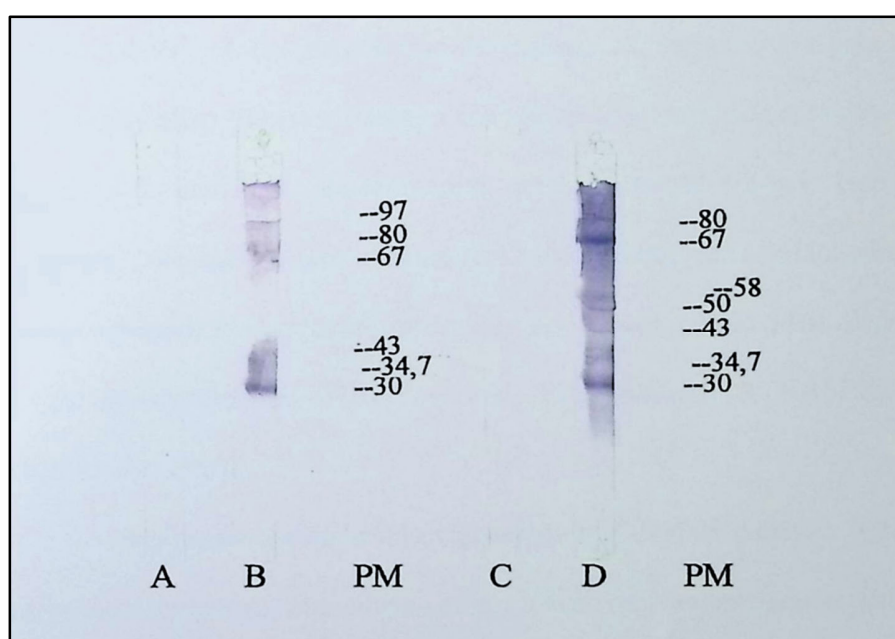


Figura 9- Western Blotting de *Toxoplasma gondii*, cepa congênita frente a soro de coelho e cão: Cão negativo (A), cão positivo (B), coelho negativo (C), coelho positivo (D) e peso molecular (PM).

NAOT *et alii* (1993), verificaram que anticorpos da classe IgG respondem a carboidratos e proteínas de taquizoítas, responsáveis pela invasão à célula do hospedeiro. Desta maneira, a invasão esteve associada a muitas proteínas de superfície da membrana do taquizoíto, sendo responsáveis pela fase aguda da toxoplasmose; enquanto a fase crônica tem sido caracterizada, principalmente, por antígenos excretados/ secretados, presentes no citosol, sendo identificados como antígenos imunoprotetores (NAOT *et alii*, 1983; WARE & ICASPER, 1987 e CHARIF *et alii*, 1990).

No presente estudo foi evidenciado que os dois sistemas de hospedeiro distintos, um herbívoro lagomorfo e um carnívoro mostraram-se passíveis ao reconhecimento a partículas proteicas de ambos os extratos antigênicos, através de anticorpos policlonais da classe IgG. O que vem corroborar com observações descritas anteriormente, assegurando o grau de pureza dos extratos utilizados.

CAMARGO *et alii*, 1978 e MINEO *et alii*, 1980, observaram que anticorpos IgM são evidenciados na resposta para moléculas de um complexo glicoprotêico, enquanto que anticorpos da classe IgG reconhecem, principalmente, compostos protéicos dos taquizoítas de *T. gondii*.

A diversidade de determinantes antigênicos verificada , é justificável pois, cepas distintas de *T. gondii* isoladas de diversos hospedeiros, nos cinco continentes, apresentam diversidade de virulência e antigenicidade; sendo ligadas às características fenotípicas, embora as cepas isoladas possam ter a mesma identidade genotípica (WARE & KASPER, 1986; SIBLEY & BOOTHREYD, 1992 e GUO & JOHNSON, 1995).

Estudos realizados por HANDMAN *et alii* (1980), demonstraram que taquizoítas de *T. gondii* possuem quatro proteínas de superfície de membrana, que são reconhecidas por soros obtidos de camundongos infectados.

A maioria dos compostos, obtidos de extratos de taquizoítas é de composição proteica. Assim, HUYHES & BALBOUR (1981), reportaram que 11 determinantes antigênicos em soro de indivíduos com toxoplasmose, foram reconhecidos em preparações de antígenos solúveis de taquizoítas. Segundo os mesmos autores, nove dessas moléculas eram de natureza protéica, uma , um lipopolisacarídeo e outra uma glicoproteína.

A proteína de peso molecular 30 Kd tem sido referenciada como responsável por níveis significantes de anticorpos; essa tem sido testada como indutora de proteção imunitária a camundongos, e vem sendo utilizada em testes sorológicos para detecção da toxoplasmose (JOHNSON *et alii*, 1983; ARAÚJO & REMINGTON, 1984; KASPER *et alii* 1985 e SANTORO *et alii*!, 1985). No presente estudo, observou-se que essa molécula foi reconhecida, tanto pelo coelho como pelo

ção, embora sua participação na constituição dos extratos antigênicos, aqui utilizados, mostrou-se em menor concentração do que o que foi observado por SANTORO *et alii* (1985).

5. CONCLUSÕES

1. Os taquizoítas das amostras coração e cérebro são da espécie *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909;
2. A diferença da capacidade de invasão em macrofagos peritoneais por zoítas de *T. gondii*, nas duas amostras estudadas, está relacionada provavelmente com a adaptação do parasito ao hospedeiro, quando se comparou com a cepa “C”;
3. Ao se analisar as amostras cérebro e coração, observou-se que os perfis protéicos eram distintos, mesmo quando comparados à cepa “C”, evidenciando-se com isso, variações intraespecíficas observadas em uma mesma espécie hospedeira;

4. Da mesma maneira, ao se analisar os zimogramas, observou-se que haviam percentuais distintos nas concentrações protéicas entre as amostras cérebro e coração e dessas com a cepa “C” do parasito;

5. Apesar do parasito ter sido isolado de uma galinha, este foi capaz de se desenvolver em camundongos albinos. Esta afirmativa toma-se relevante quanto a capacidade do parasito desenvolver-se em vários hospedeiros;

6. Assim, ao se utilizar soro hiperimune de coelho e soro de cão inoculado com *T. gondii*, verificou-se que esses reconhecem determinantes antigênicos para ambas as amostras estudadas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AMATO NETO, V.; CAMPOS, R.; BARUZZI, R.G.; DUARTE, M.I.S. 1982.

Toxoplasmose. Monografias Médicas. 10o V. Ed. Sarvier, São Paulo 159 p.

AMENDOEIRA, M.R.R. & COUTINHO, S.G. 1982. Isolation of *Toxoplasma*

gondii from the saliva and tonsils of a 3 year-old child. J. Infect. Dis. 145: 587.

ANDREWS, A.T. 1981. Eletrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications. Monographs on Physical Biochemistry. Clarendon Press. Oxford. 336 p.

- ARAUJO, F.G., DUBEY, J.P. & REMINGTON, J.S. 1984. Antigenic similarity between the coccidian parasites *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi*. *J. Parasitol.*, 31: 145-147.
- BJERKÂS, I.; JENKINS, M.C. & DUBEY, J.P. 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1: 214-221.
- BLAKE, M.S. JOHNSTON, K.H.; RUSSEL-JONES, G.L. & GOTSCHLICH, E.C. 1984. A Rapid, Sensitive Method for Detection of Alkaline Phosphatase-Conjugated Antibody on Western Blots. *Anal. Biochem.* 136: 175-179.
- BLANCO, J.C.; ANGEL, S.O.; MACRO, E.; PSZENNY, V.; SERPENTE, P. & GARBERI, J.C. 1992. Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and the usefulness for parasite detection. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, 46:350-357.
- BLOOMFIELD, M.M & REMINGTON, J.S. 1970. Comparison of Three Strains of *Toxoplasma gondii* by Polyacrilamide-Gel Eletrophoresis. *Trop. Geogr. Med*, 22: 367-370.

- BORST, P., OVERDULVE, J.P., WEIJERS, P.J., FASE-FLOWER, F. & VAN DEN BERG, M. 1984. DNA circles with cruciformis from *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*. *Biochism. Biophys. Acta*, 781: 100-111.
- CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W.; MINEO, J.R.; TSKIGUTI, C.K. & NAKAHARA, O.S. 1978. Immunoglobulin G and Immunoglobulin M Enzyme Linked Immunoabsorbent assays and Defined Toxoplasmosis Serological Patterns. *Infect. Immun.* 21: 55-58.
- CARINI, A. 1909. Reproduction experimentale de la toxoplasmose du lapin. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Paris*, 2: 465-469.
- CASTELLANI, A. 1914. Note on certain protozoa-like bodies in a case of protracted fever with splenomegaly. *J. Trop. Med. Hyg.*, 17: 113-114.
- CHARIF, H.; DARCY, F.; TORPIER, M.F.C.D. & CAPRON, A. 1990. *Toxoplasma gondii*: Characterization and Localization of Antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.*, 71:114-124.
- CHIAPPINO, M.L.; NICHOLS, B.A. & O'CONNOR, G.R. 1984. Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. *J. Protozool.*, 31: 288-292.

- CHIARI, C.A. & NEVES, D.P. 1984. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 79: 337-340.
- CHRISTIE, E. & DUBEY, J.P. 1977. Cross-immunity between *Hammondia* and *Toxoplasma* infections in mice and hamsters. Infec. Immun., 18: 412-415.
- CORNELISSEN, A.W.C.A. 1982. Ploidy, meiosis and sex differentiation in *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii* with some considerations on other coccidian parasites. A study combining the results of monoclonal infection and cytophotometry. Thesis, State University of Utrecht, Amsterdam
- COX, F.E.G. 1981. A new classification of the parasitic protozoa. Protozool. Abst., 5: 9-14.
- DECOSTETER, A.; DARCY, F. & CAPRON, A. 1988. 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.
- DUBEY, J.P. 1986. Toxoplasmosis. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 189: 166-170.

- DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J. & UGGLA, A. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 192: 1269-1285.
- DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. & FRENKEL, J.K. 1970a. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Parasitol.*, 56:447-456
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L. & FRENKEL, J.K. 1970b. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cats feces. *J. Exp. Med*, 132: 636-662.
- DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P.; LOPES C.W.G.; WILLIAMS, J.F.; WILLIAMS, C.S.F. & WEISBRODE, S.E. 1980. Caprine toxoplasmosis. Abortion, clinicals signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 1072-1076.
- DUBEY, J.P. & LINDSAY, D.S. 1993. Neosporosis. *Parasitol. Today*. 9 (12): 452-458.
- DVORAK, J.A. & HOWE, C.L. 1979. *Toxoplasma gondii* vertebrate cell interations: II. The intracellular reproductive phase. *J. Protozool.*, 26: 114-117.

- FISZMAN, M. & COUTINHO, S.G. 1980. Estudo da Reprodutibilidade da Reação de Imunofluorescência Indireta para Pesquisa de Anticorpos Séricos para *Toxoplasma gondii*, Utilizando-se Quatro Cepas Diferentes do Parasito como Antígeno. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 75; 89-97.
- FRENKEL, J.K. 1972. Toxoplasmosis. Mecanismos of infection, laboratory diagnosis and management. Curr. Top. Pathol., 54: 28-75.
- FRENKEL, J.K. 1972. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology, and immunity. In. HAMMOND, D.M. & LONG, P.L. The coccidia. Univ. Park Press, Baltimore, 9: 343-410.
- FRENKEL, J.K. 1977. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents with a reclassification of the cyst-forming isosporoid coccidia. *J. Parasitol.*, 63: 611-628.
- FRENKEL, J.K. 1990. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 196:233-240.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P., & MILLER, N.I. 1969. *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. Science, 164: 432-433.

- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. & MILLER, N.I. 1970. *Toxoplasma gondii*: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science, 167: 893-896.
- FRENKEL, J.K. 1973. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: HAMMOND, D.M. & LONG, P.L. The coccidia: Eimeria, *Isospora*, *Toxoplasma* and Related Genera. University Park Press, Baltimore, 482p.
- FRENKEL, J.K. 1986. La inmunidad en la toxoplasmosis. Bol. Of Sanit. Panam., 100: 283-299.
- GUO, Z.G.& JOHNSON, A.M. 1995. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction. Parasitology., 111: 127-132.
- GUSTAFSON, P.V.; AGAR, H.D. & CREMER, D.I. 1954. An electron microscope study of *Toxoplasma*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 3: 1008-1021.
- HANDMAN, E. & REMINGTON, J.S. 1980. Sorological and immunological characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. Immunol, 40: 579-588.

- HANDMAN, E.; GODING, J.W. & REMINGTON, J.S. 1980. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, 124: 2578-2583.
- HANDMAN, E. & REMINGTON, J.S. 1980. Antibody Response to Toxoplasma Antigens in Mice Infected with Strains of Different Virulence. *Infect. And Immun*, 29: 215-220.
- HIRT, J.; ALBESI, E.J.; DI BARTOLO, I.; JURGENS, E.E.; MONTEVERDE, D.A.; MORGENFELD, M.C. & SOMOZA, M.J. 1974 *Toxoplasmosis*. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 234 p.
- HUGHES, H.P.A. 1985. Toxoplasmosis- a neglected disease. *Parasitol. Today*, 1: 41-44.
- HUGHES, H.P.A & BALFOUR, A. 1981. An Investigation of the Antigenic Structure of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Immunol.* 3: 235-248.
- HUTCHISON, W.M. 1965. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206: 961-962.

- HUTCHISON, W.M. 1967. The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61: 80-89.
- JAMRA, L.F.; DEANE, M.P.; MION, D. & GUIMARAES, E.C. 1971. Isolation of
Toxoplasma gondii from human tonsils. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol., 4: 97-
102.
- JEWELL, M.L.; FRENKEL, J.K.; JOHSON, K.M.; REED, V. & RUIZ, A. 1972.
Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical Felidae. Amer. J. Trop.
Med. Hyg., 21: 512-517.
- JOHNSON, A.M.; McDONELD, P.J. & HEOH, S.H. 1983. Monoclonal antibodies
of *Toxoplasma gondii* membrane surface antigens protect mice from
toxoplasmosis. J. Protozoa, 30:351-356.
- KASPER, L.H. & WARE, P.L. 1985. Recognition and characterization of stage-
specific oocyst/sporozoite antigens of *T. gondii* by human antiserum. J. Cl
in. Invest., 75: 1570-1577.
- KASPER, L.H.; CRABB, J.H. & PFEFFERKORN, E.R. 1982. Isolation and
characterization of a monoclonal antibody resistant antigenic mutant of
Toxoplasma gondii J. Immunol, 129: 1694-1699.

- KASPER, L.H.; CRABB, J.H. & PFEFERKORN, E.R. 1983. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.*, 130: 2407-2412.
- KASPER, L.H.; BRADLEY, M.S. & PFEFFERKORN, E.R. 1984. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 132: 443-449.
- KAUFMAN, H.E.; REMINGTON, J.S. & JACOBS, L. 1958. Toxoplasmosis: the nature of virulence. *Am. J. Ophthalmol.*, 46: 255-261.
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, J., LYNN, D., MERINFIELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. & WALLACE, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, 27: 37-58.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265- 275.

- LUNDE, M.N. & JACOBS, L. 1965 Antigenic relationship of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. *J. Parasitol.*, 51: 273-276.
- LUNDE, M.N. & JACOBS, L. 1983. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 69: 806-808.
- LYCKE, E. & LUNDE, E. 1964. A Tissue Culture Method for Titration of Infective and Determination of Growth Rate of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. et Microbiol. Scand*, 60: 209-220.
- MEHLHORN, H. & FRENKEL, J.K. 1980. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J. Parasitol.*, 66: 59-67.
- MELLO, U. 1910. Un cas de toxoplasmose du chien observe a Turin. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Paris*, 3: 359-363.
- MIGLIANO, L. 1913. Os toxoplasmas. Tese. Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.

- MILLER, N.I. , FRENKEL, J.K. & DUBEY, J.P. 1972. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.*, 58: 928-937.
- MINEO, J.R.; CAMARGO, M.E. & FERREIRA, A.W. 1980. Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay for Antibodies to *Toxoplasma gondii* Polisaccharides in Human Toxoplasmosis. *Infect. Immun.*, 27: 283-287.
- NAOT, Y.; GUPTILL, D.R.; MULLENAX, J. & REMINGTON, J.F. 1983. Characterization of *Toxoplasma gondii* antigens that react with human immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies. *Infect. Immun.*, 41:331-338.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. 1908. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comp. R. Acad. Sci. (Paris)*, 147: 763-766.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. 1909. Sur un protozoaire nouveau do gondi. *Comp. R. Acad. Sci. (Paris)*, 148: 369-372.

- NICHOLS, B.A. & O'CONNOR, G.R. 1981. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*: new evidence for active invasion and phagocytosis. Lab. Invest., 44: 324-335.
- NICHOLS, B.A.; CHIAPPINO, M.L. & O'CONNOR, G.R. 1983. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion J. Ultrastruct. Res., 83: 55-98.
- PARTANEN, P.; TURUNEN, H.J.; PASSIVUO, R.; FORSBLOM, E.; SUNI, J. & LEINIKKI, P.O. 1983. Identification of antigenic components of *Toxoplasma gondii* by an immunoblotting technique. FEBS LETT. 158: 252-254.
- PIEKARSKI, G. & WITTE, H.M. 1971. Experimental and histological studies of *Toxoplasma* infections in cats. Z. Parasitenkd., 36: 95-121.
- PROWAZEK, S. VON 1910. Parasitische protozoen aus Japan, gesammelt von Herr Dr. Mine in Fukuoka. Archiv. Schil Trop. Hyg., 14: 297-302.
- RUIZ, A. & FRENKEL, J.K. 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. Am. J. Trop. Med Hyg., 29: 1161-1166.

- SABIN, A.B. 1939. Biological and Immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 41: 75-80.
- SANGIORGI, G. 1913. Un nuevo protozoo parassita del *Mus musculus*. *Pathologica*, 5: 323-325.
- SANTORO, F.; AFCHAIN, D.; PIERCE, R.; CESBRON, Y.; OVLAQUE, G. & CAPRON, A. 1985. Serodiagnosis of *Toxoplasma* Infection Using a Purified Parasite Protein (P30). *Clinic. and Exp. Immunol*, 62: 262-269.
- SCHAEFER, R.L. & ANDERSON, R.B. 1989. The Student Edition of the MINITAB. Wesley Pub. Co. Inc., 365 p.
- SARGENT, J.R. & GEORGE, S.G. 1975. *Methods in Zone Eletrophoresis*. BDH Chemicals Ltd. Poole. England. 219 p.
- SHARMA, D.D.; ARAI-JJO, F.G. & REMINGTON, J.S. 1984. *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J. of Immunol*, B3:2818-2820.

- SHEFFIELD, H.G. & MELTON, M.L. 1968. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 54: 209-226.
- SHEFFIELD, H.G. & MELTON, M.I. 1969. *Toxoplasma gondii*: transmission through feces in absence of *Toxocara cati* eggs. *Science*, 164: 431-432.
- SIBLEY, L.D. & BOOTHROYD, J.C. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359: 82-85.
- SIBLEY, L.D. & SHARMA, S.D. 1987. Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infect. Immun.*, 55:2137-2141.
- SMITH, D.D. 1980. The Sarcocystidae: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Hammondia* and *Cystoisospora*. *J. Protozoa*, 27: 37-58.
- SOUZA, W.J.S. 1986. Aspectos soropidemiológicos da toxoplasmose em escolares no Rio de Janeiro. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 79 p.
- SPLENDORE, A. 1908. Un nuevo protozoa parassita de'conigli. *Rev. Soc. Scient. Sao Paulo*, 3: 109-112.

SPLENDORE, A. 1909. Sur un nouveau protozoaire parasite du lapin. Bull. Soc. Pathol. Exot. Paris, 2: 462-465.

SUGGS, M.; WALLS, K.W. & KAGAN, I.G. 1968. Comparative antigenic study of *Besnoitia jellisoni*; *B. panamensis*, and five *Toxoplasma* isolates. *J. Immunol.*, 101: 166-175.

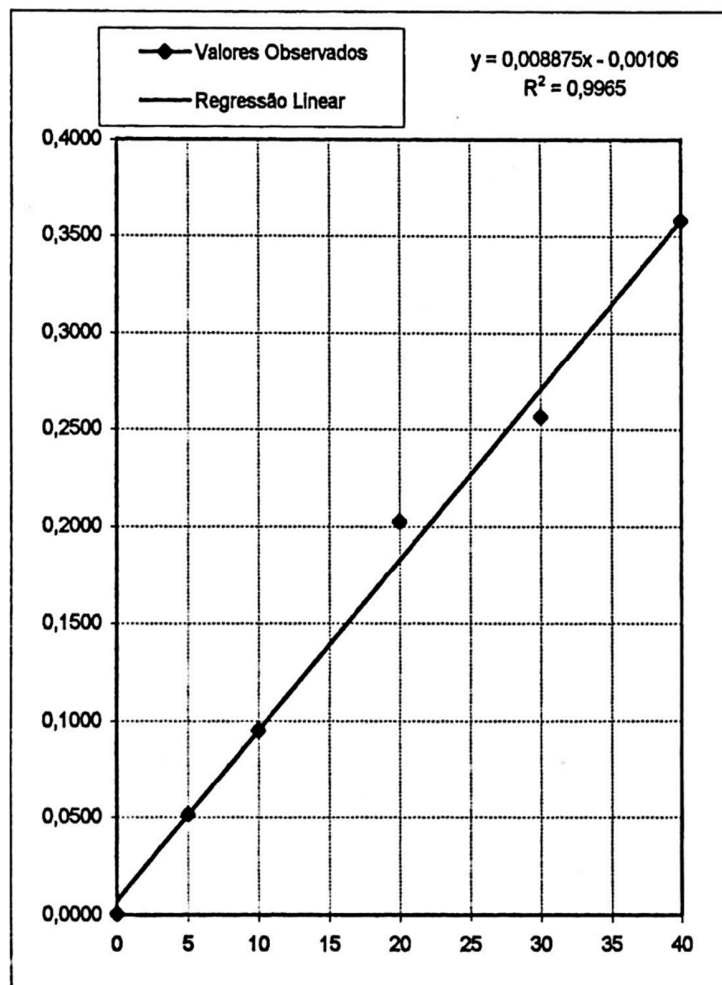
WALLACE, G.D. 1973. Intermediate and transport hosts in the natural history of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22: 456-464.

WARE, P.L. & KASPER, K.H. 1987. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, 55:778-783.

VERHOFSTEDDE, C.; VAN GELDER, P. & RABAEY, M. 1988. The infection-stage-related IgG response to *Toxoplasma gondii* studied by immunoblotting. *Parasitol. Res.*, 74: 516-520.

7. APÊNDICES

Apêndice 01. Curva de calibração de BSA para dosagem de proteínas.

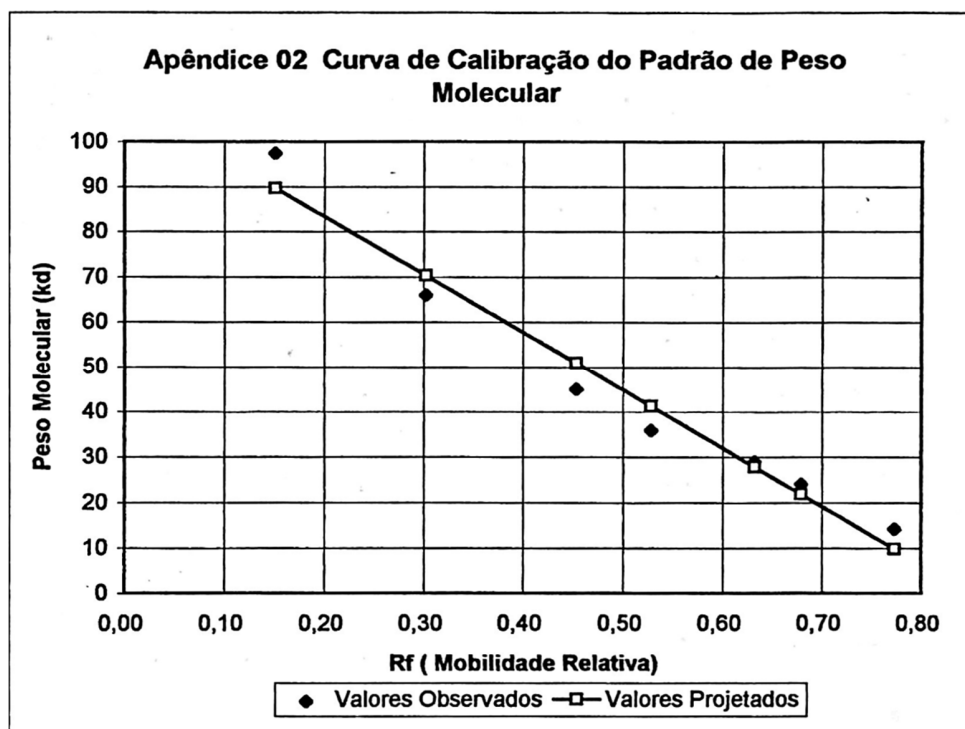


TUBOS	Volume BSA (1mg/ml)	Média	Leitura 1	Leitura 2	Valores Obtidos pela Regressao
1	0	0,0005	0,000	0,001	0,00737
2	5	0,0515	0,042	0,061	0,05117
3	10	0,0950	0,086	0,104	0,09497
4	20	0,2025	0,214	0,191	0,18257
5	30	0,2565	0,254	0,259	0,27017
6	40	0,3580	0,341	0,375	0,35777

BSA= Soro albumina bovina

Coef. Angular	0,00876
1/Coef. Angular	114,155
Intercept	0,0073667

concentração protéica	
cérebro	2,64 mg/ml
coração	1,05 mg/ml
congénita	2,22 mg/ml



slope -128,3862037
Intercept 109,0375235

Rf (Mobilidade Relativa)	Peso Molecular (kd) Valores Observados	Forecast Valores Projetados
0,15	97,4	89,7
0,30	66	70,3
0,45	45	50,9
0,53	36	41,2
0,63	29	27,9
0,68	24	21,9
0,77	14,2	9,8