MARCELO DE SOUZA ZANUTTO

**Dinâmica da infecção toxoplásmica em
felinos infectados pelo Vírus da
Imunodeficiência Felina**

**SÃO PAULO
2005**

MARCELO DE SOUZA ZANUTTO

Dinâmica da infecção toxoplásmica em felinos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Felina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Médica

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Mitika Kuribayashi Hagiwara

São Paulo
2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1495
FMVZ

Zanutto, Marcelo de Souza
Dinâmica da infecção toxoplásmica em felinos infectados pelo
Vírus da Imunodeficiência Felina / Marcelo de Souza Zanutto. –
São Paulo : M. S. Zanutto, 2005.
116 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica,
2005.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara.

1. Gatos. 2. Felinos. 3. Vírus da Imunodeficiência Felina.
4. *Toxoplasma gondii*. 5. Co-infecção. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da infecção toxoplásmica em gatos infectados pelo vírus da imunodeficiência felina", sob a responsabilidade da Prof^aDr^a Mitika Kuribayashi Hagiwara, Protocolo nº 07/2001, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21 de novembro de 2001.

Obs: O projeto não contempla o destino dos animais infectados após o término do projeto.

São Paulo, 03 de dezembro de 2001

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome do autor: ZANUTTO, Marcelo de Souza

Título: Dinâmica da infecção toxoplásmica em felinos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência felina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

"Navegue, descubra tesouros,mas não os tire do fundo do mar,o lugar deles
é lá.
Admire a lua,sonhe com ela,mas não queira trazê-la para a terra.
Curta o sol, se deixe acariciar por ele, mas lembre-se que o seu calor é para
todos.
Sonhe com as estrelas,apenas sonhe, elas só podem brilhar no céu.
Não tente deter o vento, ele precisa correr por toda parte, ele tem pressa de
chegar sabe-se lá onde.
Não apare a chuva, ela quer cair e molhar muitos rostos, não pode molhar só o
seu.
As lágrimas? Não as seque, elas precisam correr na minha, na sua, em todas
as faces.
O sorriso! Esse você deve segurar, não deixe-o ir embora, agarre-o!
Quem você ama? Guarde dentro de um porta jóias, tranque, perca a chave!
Quem você ama é a maior jóia que você possui, a mais valiosa.
Não importa se a estação do ano muda, se o século vira e se o milênio é
outro, se a idade aumenta; conserve a vontade de viver, não se chega à parte
alguma sem ela.
Abra todas as janelas que encontrar e as portas também.
Persiga um sonho, mas não deixe ele viver sozinho.
Alimente sua alma com amor, cure suas feridas com carinho.
Descubra-se todos os dias, deixe-se levar pelas vontades,mas não enlouqueça
por elas.
Procure, sempre procure o fim de uma história,seja ela qual for.
Dê um sorriso para quem esqueceu como se faz isso.
Acelere seus pensamentos, mas não permita que eles te consumam.
Olhe para o lado, alguém precisa de você.
Abasteça seu coração de fé, não a perca nunca.
Mergulhe de cabeça nos seus desejos e satisfaça-os.
Agonize de dor por um amigo, só saia dessa agonia se conseguir tirá-lo
também.
Procure os seus caminhos, mas não magoe ninguém nessa procura.
Arrependa-se, volte atrás, peça perdão!
Não se acostume com o que não o faz feliz, revolte-se quando julgar
necessário.
Alague seu coração de esperanças, mas não deixe que ele se afogue nelas.
Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente.
Se estiver tudo certo, continue.
Se sentir saudades, mate-a.
Se perder um amor, não se perca!
Se achá-lo, segure-o!"

Fernando Pessoa

Aos meus pais, Dora e Carlos (in memoriam), aos meus irmãos
Milene e Rafael pelo Amor da família, de minha origem.

"Mas há a vida que é para ser intensamente vivida, há o
amor.
Que tem que ser vivido até a última gota.
Sem nenhum medo. Não mata."

Clarice Lispector

Ao Fernando, por todos esses anos de companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Mitika Kuribayashi Hagiwara pelos ensinamentos e conselhos transmitidos durante todos estes anos, não apenas durante o curso de pós-graduação, mas desde a primeira aula ministrada. Um exemplo a ser seguido.

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela disponibilização em desenvolver parte do experimento no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Prevenção e Saúde, e pela possibilidade de conhecer e conviver com seus pós-graduandos e funcionários (Alessandra, Hilda, Pedrinho e Renato).

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto e Dr^a. Silvia Morgulis pela permissão em desenvolver a técnica de citometria de fluxo no Departamento de Patologia da FMVZ-USP e pelo convívio agradável.

À Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire (Universidade Estadual de Londrina) pela doação da cepa de *T. gondii* utilizada no experimento.

Ao Prof. Dr. João Pessoa de Araújo Júnior pela caracterização molecular do Vírus da Imunodeficiência Felina utilizado, como também pela confirmação das infecções nos Grupos experimentais.

À Prof^a Dr^a. Denise Pimentel Bergamaschi pelo auxílio estatístico e os agradáveis cafés.

À Universidade de São Paulo, à FMVZ e, em especial ao Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, na figura de seus docentes e funcionários, pelos ensinamentos e experiências vitais para a boa formação do profissional, docente e pessoa.

À Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, em especial, ao Departamento de Patologia e Clínicas, na figura de seus docentes e funcionários, pela compreensão nas liberações de minhas atividades para a conclusão do curso de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa (processo nº 00/14061-1) durante os dois primeiros anos de atividade.

Aos colegas de pós-graduação Márcia Hasegawa, Márcia Notomi, Helena, Luiz, Juliana, Keila, Leonardo, Neria, Tilde, Adriana, Janis, Pedro, Luciane, Cláudia Madalena, Ênio, Mere e Karina pelo apoio e convívio agradáveis.

Às bolsistas Melissa, Priscila e Roberta pelo auxílio nas colheitas e processamento de material.

Às colegas Ana Rosa, Jamille e Camila, pelo prazer em orientador meus primeiros, e compreender em respeitar a velocidade de aprendizado de cada um. Sentir a posição do Orientador na formação de seus orientados.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ-USP, pela presteza sorridente em dirimir dúvidas.

Às empresas Fort Dodge Saúde Animal e Nestlé, pelas doações de vacinas, ração e granulado sanitário durante todo o período experimental.

Aos gatos:

1. Idriel, Luciella, Murilo, Scaravel, Venza, Zandru e Zenda;
2. Brynat, Carlina, Haldran, Haleine, Liriel, Marzan, Sennedjen;
3. Arthur, Hammerfell, Hellers, Jerana, Neskaya, Rodolfo, Valeron;
4. Amalie, Damisela e Dryland.

Cada liberação ao solário era um dia de festa. Chegar na sala e ser recebido com o miado ou simples olhar de atenção específico de cada um. Agradeço por fazer amadurecer o equilíbrio do pesquisador em mensurar, calcular e projetar ao mesmo tempo em que convivia com os sentimentos de um proprietário atencioso e amoroso. Fazer conviver bem com a Coruja e o Corvo postados em cada ombro na medida em que se passavam os dias, até nossa despedida, e o fim de suas vidas.

A Ele, à Ela, a Deus, à Deusa, ao Pai, à Grande Mãe, à Oxalá, sabe-se lá qual a melhor denominação, do *Motivo* que dá a Vida, permitir sentimentos tão díspares em criar, amar, enternecer-se; cruzar caminhos com outros tão queridos e não tão queridos, mas também importantes, e principalmente por permitir a conclusão de uma etapa, um ponto final na última frase de mais um livro desta *Vida*.

"O mal de quase todos nós é que preferimos ser arruinados pelo elogio a ser salvos pela crítica."

Norman Vincent

"Sede prudentes como as serpentes e simples como as pombas."

Mateus 10,16

RESUMO

ZANUTTO, M. S. **Dinâmica da infecção toxoplásmica em felinos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Felina.** [Dynamics of toxoplasmic infection in cats infected by Feline Immunodeficiency Virus]. 2005. 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Para avaliar se a dinâmica da infecção toxoplásmica em gatos infectados pelo VIF é diferente daquela que ocorre em gatos não infectados por esse retrovírus, gatos adultos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (VIF) clade B assintomáticos (n=7) (Grupo I: VIF+TOXO+), e gatos sem a infecção viral (n=7) (Grupo III: VIF-TOXO+) foram inoculados pela via oral com cistos de *Toxoplasma gondii* cepa P. Os animais foram avaliados por meio do exame clínico, mensuração de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta, eliminação e quantificação de oocistos pela técnica de flutuação em solução de sacarose, leucograma, e as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ foram mensuradas por meio da citometria de fluxo. Outros dois grupos de gatos, um apenas infectado com o VIF (n=7) (Grupo II: VIF+TOXO-) e outro não infectado com nenhum dos agentes (n=3) (Grupo IV: VIF-TOXO-), constituíram os grupos controle. O período de eliminação de oocistos e a quantidade de oocistos eliminados foram semelhantes entre os Grupos I e III, respectivamente $p=1,00$ e $p=0,201$. O período de soroconversão e a duração dos títulos de IgM e IgG também foram semelhantes, respectivamente $p=0,535$; $p=0,789$ e $p=0,674$; $p=0,123$. No entanto, os episódios febris e de apatia foram mais freqüentes entre os gatos co-infectados (Grupo I) do que entre os animais do grupo não infectado com o vírus (Grupo III), embora estes

últimos tenham apresentado diarreia mais frequente e intensa do que os primeiros. Apenas no grupo co-infectado (Grupo I) um animal desenvolveu uveíte anterior unilateral autolimitante. Exclusivamente no grupo de gatos co-infectados (Grupo I), durante todo o período experimental foi observado aumento do número de leucócitos ($p=0,047$), linfócitos ($p=0,029$) e linfócitos T CD8+ ($p=0,047$) em relação aos gatos do grupo infectado apenas com o *T. gondii* (Grupo III). O grupo de gatos infectados somente com o VIF (Grupo II) apresentou diminuição quantitativa de linfócitos T CD4+ ($p=0,031$) em comparação ao grupo controle não infectado com nenhum dos agentes (Grupo IV), evidenciando a ação do vírus em destruir progressivamente essa subpopulação de linfócitos. A relação de linfócitos CD4/CD8 entre os Grupos I e II, infectados pelo VIF, e os Grupos III e IV, não infectados pelo vírus, foi alterada ($p<0,001$ e $p=0,002$ respectivamente), observando-se que a infecção toxoplásmica não teve influência sobre esse parâmetro. O aumento dos linfócitos T CD8+ nos gatos co-infectados e a diminuição de linfócitos T CD4+ causada pela infecção pelo VIF podem contribuir para o desenvolvimento de manifestações clínicas mais graves nos gatos infectados por ambos os agentes infecciosos.

Palavras-chave: Felinos. Gatos. *Toxoplasma gondii*. Vírus da Imunodeficiência Felina. Co-infecção.

ABSTRACT

ZANUTTO, M. S. **Dynamics of toxoplasmic infection in cats infected by Feline Immunodeficiency Virus.** [Dinâmica da infecção toxoplásmica em felinos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Felina]. 2005. 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Asymptomatic adult cats (n=7) infected with Feline Immunodeficiency Virus (FIV) clade B (Group I: FIV+TOXO+) and normal non-infected cats (n=7) (Group III: FIV-TOXO+) were inoculated, orally with cysts of *Toxoplasma gondii* strain P, in order to evaluate if there is a difference in dynamics of toxoplasmic infection between cats infected with FIV and naive-FIV cats. The animals were assessed by means of physical exam, *T. gondii* IgM and IgG antibodies by indirect immunofluorescent reaction, shedding and quantification of oocysts using sugar centrifugation, leucogram and CD4+ and CD8+ T-lymphocytes subsets using cytometry. Others two groups of cats, one of them only infected with FIV (n=7) (Group II: FIV+TOXO-) and other non-infected (n=3) (Group IV: FIV-TOXO-) composed the control groups. The shedding and quantification of oocysts were not different between the Groups I and III, respectively $p=1,00$ and $p=0,201$. The serum conversion and the period that during of values of IgM and IgG antibodies were not different, respectively $p=0,535$; $p=0,789$ and $p=0,674$; $p=0,123$. However, fever and letargy were more frequent between cats co-infected (Group I) than the group not infected with FIV (Group III), although the latter one had presented more frequently intense diarrhea than formers. Just one cat dually infected (Group I) presented autolimitant unilateral anterior uveitis. Only cats co-infected (Group I), during all period of the experiment, presented increase in number of leukocytes ($p=0,047$), lymphocytes ($p=0,029$) and CD8+ T

lymphocytes subset ($p=0,047$) comparing to the cats only infected with *T. gondii* (Group III). Only in the group FIV-infected (Group II) was observed decrease in numbers of CD4+ T lymphocytes subset ($p=0,031$) compared to the not infected any microorganism (Group IV), showing the virus action to destroy this lymphocyte subset slowly. The CD4/CD8 lymphocyte ratio was different between the Groups I and II, FIV-infected, from Groups III and IV, FIV-naive cats, ($p<0,001$ e $p=0,002$ respectively) showing that toxoplasmic infection did not alter this parameter. The increase number of CD8+ T lymphocyte, in dually infected cats, associated with loss of CD4+ T lymphocyte caused by FIV, can contribute for the development of more severe clinical signs in cats dually infected.

Keywords: Feline. Cats. *Toxoplasma gondii*. Feline Immunodeficiency Virus. Co-infection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Uveíte anterior unilateral direita(A) do gato número 1 do Grupo I (VIF+TOXO+) no 11^o dpi. Observar *rubeosis iridis* tênue, flare + e precipitados ceráticos em pequena quantidade na câmara anterior ventralmente. B: olho esquerdo normal. São Paulo, 2002-2003..... 67
- Figura 2 - Citogramas ilustrando as fluorescências de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico do gato número 4 do Grupo III (VIF-TOXO+) (A) e do gato número 1 do Grupo I (VIF+TOXO+) (B) antes da inoculação com *T. gondii*. As porcentagens em cada quadrante indicam a porcentagem de cada subpopulação de linfócito T em cada animal. Os números nos quadrantes superiores à direita indicam o valor da relação CD4/CD8 de cada animal. A figura A ilustra o citograma de um felino não infectado com nenhum dos agentes com a relação CD4/CD8 na faixa de normalidade para a espécie. A figura B ilustra o citograma de um felino infectado com o VIF. Note-se que neste animal já ocorre inversão da relação CD4/CD8 resultante da infecção viral. São Paulo, 2002-2003..... 72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil médio dos valores absolutos de leucócitos / mm ³ dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003.....	69
Gráfico 2 - Perfil médio dos valores absolutos de neutrófilos segmentados / mm ³ dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003.....	70
Gráfico 3 - Perfil médio dos valores absolutos de linfócitos / mm ³ dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003.....	71
Gráfico 4 - Perfil médio dos valores absolutos da subpopulação de linfócitos T CD4+ dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003.....	73
Gráfico 5 - Perfil médio dos valores absolutos da subpopulação de linfócitos T CD8+ dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003.....	74
Gráfico 6 - Perfil médio da relação de linfócitos T CD4/CD8 dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) segundo o dia de eliminação de oocistos de <i>T. gondii</i> . São Paulo, 2002-2003.....	59
Tabela 2 - Número de felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) que apresentaram a eliminação de oocistos de <i>T. gondii</i> segundo o dia. São Paulo, 2002-2003.....	60
Tabela 3 - Número de oocistos eliminados pelos felinos do Grupo I (VIF+TOXO+) segundo o dia após a infecção por <i>T. gondii</i> . São Paulo, 2002-2003.....	61
Tabela 4 - Número de oocistos eliminados pelos felinos do Grupo III (VIF-TOXO+) segundo o dia após a infecção por <i>T. gondii</i> . São Paulo, 2002-2003.....	62
Tabela 5 - Distribuição de felinos segundo o número de oocistos de <i>T. gondii</i> eliminados nas fezes por dia dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+). São Paulo, 2002-2003.....	63
Tabela 6 - Títulos de anticorpos (IgM) anti- <i>T. gondii</i> em felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+). São Paulo, 2002-2003.....	65
Tabela 7 - Títulos de anticorpos (IgG) anti- <i>T. gondii</i> em felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+). São Paulo, 2002-2003.....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3	MATERIAL E MÉTODO.....	47
3.1	Animais.....	48
3.2	Preparo do inóculo de <i>Toxoplasma gondii</i>	50
3.3	Quantificação de Oocistos.....	52
3.4	Reação de Imunofluorescência Indireta.....	54
3.5	Contagem Total e Diferencial de Leucócitos.....	55
3.6	Citometria de Fluxo.....	56
3.7	Análise Estatística.....	57
4	RESULTADOS.....	58
5	DISCUSSÃO.....	76
6	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	94
	APÊNDICE.....	105
	ANEXO.....	115

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em gatos portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida Felina, bem como em pessoas com a contrapartida humana dessa infecção, a co-infecção por vários patógenos ocorre com frequência. Algumas evidências (DAVIDSON et al., 1993; LIN; BOWMAN; JACOBSON, 1992b; REUBEL et al., 1994) sugerem que a interação entre a resposta imune gerada por cada patógeno pode resultar no agravamento de uma e outra infecção, em decorrência da regulação cruzada entre as respostas de linfócitos T CD4+ Th1 (auxiliares 1) ou Th2 (auxiliares 2) ativados, macrófagos, neutrófilos e células NK (exterminadoras naturais) (MOSIER, 1994). Adicionalmente, e considerando que muitos desses patógenos, como o *T. gondii*, são organismos intracelulares obrigatórios, aventa-se a hipótese de que possíveis interações entre esses patógenos e o vírus dentro das células resultariam em alteração da função das células infectadas. Assim, a replicação de cada patógeno, bem como a resposta imune frente a cada um deles, podem estar alteradas.

Com base em estudos nos quais foi observada maior soroprevalência ao *T. gondii* em gatos naturalmente infectados com o VIF (D'AMORE et al., 1997; DORNY et al., 2002; LAPPIN et al., 1993; LUCAS et al., 1998; WITT et al., 1989), levantou-se a hipótese de que as alterações imunológicas determinadas pela infecção por esse retrovírus poderiam favorecer a disseminação ou a replicação do *T. gondii*, levando a quadros mais graves da infecção.

Poucos são os trabalhos experimentais que abordaram a dinâmica das infecções pelo VIF e pelo *T. gondii* em gatos com o objetivo de observar a possível reativação do

parasito, ou de estudar o efeito da prévia infecção pelo VIF sobre a resistência desses animais frente à primo-infecção com o *T. gondii*. A inoculação do VIF em gatos infectados com o *T. gondii* com evolução crônica assintomática de seis meses não provocou qualquer alteração no estado geral dos animais, assim como não propiciou a reeliminação de oocistos e pouco influenciou sobre a resposta humoral, exceto pelo aumento de IgM anti-*T.gondii* e a diminuição da blastogênese de linfócitos induzida por antígeno (LAPPIN et al., 1992a).

Davidson et al. (1993); Lappin et al. (1996b) e Lin, Bowman e Jacobson (1992b) examinaram o impacto da prévia imunodepressão desencadeada pela infecção pelo VIF no curso da infecção primária com o *T. gondii*, mas apenas o primeiro e o último concluíram que a infecção pelo VIF favoreceria o estabelecimento da toxoplasmose.

A avaliação da dinâmica entre o *T. gondii* e o retrovírus tem sido realizada em modelos animais como camundongos, gatos e macacos, para a obtenção de informações comparativas acerca da contrapartida humana dessa infecção (LACROIX et al., 1996), ainda mais quando se considera que a toxoplasmose é responsável por uma parcela significativa de quadros de encefalite em pacientes imunodeficientes (DUBEY; BEATTIE, 1988b).

Considerando que gatos infectados com o VIF podem apresentar, ao se infectarem com o *T. gondii*, quadro clínico e evolução distintos daqueles de gatos não infectados por esse retrovírus, o objetivo do presente estudo foi acompanhar a dinâmica da infecção toxoplásmica em gatos infectados com o VIF clade B, avaliando o período e a quantidade de oocistos eliminados, a soroconversão e a persistência de IgM e IgG anti-*T. gondii*, os aspectos clínicos gerais, o leucograma e as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

O *Toxoplasma gondii* é um coccídeo intestinal de felídeos, seus hospedeiros definitivos, com uma ampla variedade de hospedeiros intermediários homeotérmicos, incluindo-se o homem. Este protozoário intracelular obrigatório pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, e possui três formas distintas: taquizoíto, bradizoíto e esporozoíto. Foi descoberto por Nicolle & Manceaux, em 1908, em um roedor silvestre (*Ctenodactylus gundii*). Concomitantemente, Splendore também o descreveu em um coelho de laboratório em São Paulo, e Darling provavelmente o encontrou no homem no Panamá (DUBEY; BEATTIE, 1988a). O termo *Toxoplasma* deriva do grego e decorre de seu formato em arco crescente (toxon = arco, plasma = forma), e a palavra *gondii* é uma referência ao roedor no qual também foi descrito.

O termo toxoplasmose é utilizado para designar as condições de infecção ou doença desencadeadas pelo *T. gondii*. A infecção determinada pelo *T. gondii* é uma das mais importantes infecções parasitárias do homem e dos animais homeotérmicos (DUBEY; BEATTIE, 1988b). No homem, a soroprevalência ao *T. gondii* aumenta com a idade, sem variação entre os sexos, sendo mais baixa em regiões frias, quentes e áridas ou em altas altitudes do planeta (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). As variações na soroprevalência a este protozoário em diferentes países parecem estar correlacionadas aos hábitos de higiene e de alimentação das populações estudadas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Alta soroprevalência ao *T. gondii* foi registrada em países como a França onde o consumo de carne mal cozida é comum, e também nas

áreas tropicais da América Latina e África subsaariana, onde a presença de gatos é abundante e o clima favorece a viabilidade dos oocistos (JONES et al., 2001a). Nos Estados Unidos da América (EUA) e no Reino Unido, a prevalência varia de 16-40%, enquanto na América do Sul, na América Central e na Europa ela alcança 50-80% (DUBEY; BEATTIE, 1988b).

A primo-infecção de gestantes pelo *T.gondii* pode promover infecção fetal, que desencadeia desde retardo mental, cegueira, epilepsia até aborto, sendo a gravidade do quadro dependente do trimestre gestacional em que a mãe se infectou (DUBEY; BEATTIE, 1988b; JONES et al., 2001a; JONES et al., 2001b; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Assim, e a despeito de as possibilidades de infecção no primeiro trimestre de gestação serem menores do que no último trimestre, se a mãe se infecta no primeiro trimestre gestacional, os danos ao feto serão mais graves do que aqueles decorrentes de infecção ocorrida no último trimestre (MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Em pessoas imunocomprometidas, acometidas com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), ou submetidas a tratamento quimioterápico anti-neoplásico ou contra rejeição de órgãos, a toxoplasmose pode se manifestar sob a forma de quadros graves de encefalite, tanto na infecção aguda quanto na reativação de cistos teciduais durante a fase crônica da infecção (DUBEY; BEATTIE, 1988b; JONES et al., 2001a). Em adultos imunocompetentes a infecção geralmente é autolimitante, assintomática ou pode se manifestar com febre, apatia, cefaléia, mialgia e linfadenopatia, com resolução espontânea (DUBEY; BEATTIE, 1988b).

A grande maioria das infecções humanas ocorre por uma das seguintes vias (DUBEY, 2004; HILL; DUBEY, 2002; JONES et al., 2001a; JONES et al., 2001b; MONTOYA; LIESENFELD, 2004):

- consumo de carne crua, mal cozida ou outros alimentos contaminados;
- ingestão de oocistos presentes na água ou no solo, como nas atividades de jardinagem, manuseio ou ingestão de verduras e frutas, e limpeza da bandeja sanitária de gatos;
- infecção congênita via placenta.

Alguns estudos epidemiológicos recentes identificaram os seguintes fatores de risco para a toxoplasmose humana:

- Ter gatos (BARIL et al., 1999). Entretanto, possuir gatos não foi considerado fator de risco em dois estudos realizados com gestantes (COOK; GILBERT; BUFFOLANO, 2000; STRAY-PEDERSEN; LORENTZEN-STYR, 1980), em outro que contemplou pessoas infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (WALLACE; ROSSETTI; OLSON, 1993) e em trabalho que investigou veterinários e outros profissionais que manejam esses animais (SHUHAIBER et al., 2003);
- Na zona rural, haver gatos reagentes nas proximidades (WEIGEL et al., 1999);
- Limpar bandejas sanitárias de gatos (KAPPERUD et al., 1996);
- Ingerir carne ou produtos cárneos crus ou mal cozidos (BARIL et al., 1999; COOK; GILBERT; BUFFOLANO, 2000; KAPPERUD et al., 1996; WEIGEL et al., 1999);
- Realizar práticas de jardinagem (WEIGEL et al., 1999);
- Ter contato com o solo (COOK; GILBERT; BUFFOLANO, 2000);
- Ingerir verduras, frutas e legumes crus ou mal lavados (BARIL et al., 1999);

- Ingerir vegetais crus fora de casa (BARIL et al., 1999);
- Não realizar, com a adequação e a frequência necessárias, a limpeza de utensílios de cozinha, como facas, garfos etc (KAPPERUD et al., 1996);
- Descuidar da higiene das mãos (BARIL et al., 1999);
- Viajar para países localizados fora do continente europeu, ou da América do Norte (EUA e Canadá) (COOK; GILBERT; BUFFOLANO, 2000).

Por outro lado, os fatores protetores contra a infecção toxoplásmica incluem manter uma dieta isenta de produtos cárneos (ROGHMANN et al., 1999), morar em altas altitudes ou em climas áridos (DUBEY; BEATTIE, 1988b).

Surtos de toxoplasmose foram atribuídos à ingestão de carne ou de produtos cárneos crus ou mal cozidos, principalmente de origem suína, ovina e bovina, leite não pasteurizado caprino e à exposição à água, ao solo ou a partículas contaminadas suspensas no ar (BOWIE et al., 1997; CHOI et al., 1997; SACKS et al., 1982; TEUTSCH et al., 1979).

O processo reprodutivo do parasito pode ser dividido em dois ciclos: o enteroepitelial e o extra-intestinal. O ciclo enteroepitelial ocorre apenas em felídeos, e o extra-intestinal nos hospedeiros intermediários e definitivos do parasito (DUBEY; BEATTIE, 1988a).

O ciclo biológico do *T. gondii* é composto por três estágios infecciosos: taquizoítos, bradizoítos (nos cistos) e esporozoítos (nos oocistos).

Durante o ciclo enteroepitelial, após a ingestão de bradizoítos (cistos), cinco estruturas morfolologicamente distintas, seqüencialmente denominados de A a E (estágios de replicação enteroepitelial) são formados no enterócito felino. Essas

estruturas (ou estágios de replicação) promovem a formação de oocistos, liberados pelas fezes no meio ambiente sob a forma não esporulada, caracterizando o ciclo sexuado do parasito (DUBEY, 1998; DUBEY, 2004). O período pré-patente é de 3 a 10 dias após a ingestão de bradizoítos (DUBEY, 2001; DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995a; LAPPIN et al., 1991). O ciclo enteroepitelial pode ser desencadeado nos felinos pela ingestão de oocistos ou taquizoítos, no entanto o período pré-patente será maior quando comparado aquele induzido pela ingestão de bradizoítos. O período pré-patente após a ingestão de oocistos esporulados é de 18 dias ou mais (DUBEY, 1996; FREYRE et al., 1989), e aquele decorrente da ingestão de taquizoítos é de 19 dias ou mais (DUBEY, 2002). Dubey (1996) relatou um período pré-patente de 18 a 44 dias ao inocular 20 gatos de faixa etária compreendida entre dois e três meses de idade com a cepa VEG em diferentes concentrações de oocistos (de 100 a 10.000). Posteriormente, Dubey (2002) inoculou 46 gatos com taquizoítos das cepas M-7741 ou ME-49, e verificou que o período pré-patente foi de 19 dias ou mais.

O ciclo sexuado resultante da ingestão de bradizoítos é o mais eficiente, pois aproximadamente 100% dos gatos inoculados eliminaram oocistos, enquanto apenas 30-50% dos gatos inoculados com oocistos e taquizoítos eliminam oocistos (DUBEY, 1996; DUBEY, 2002; DUBEY; FRENKEL, 1976; FREYRE et al., 1989).

Freyre et al. (1989) levantaram a hipótese de que o ciclo assexuado do parasito seria decorrente da multiplicação deste, sob a forma de taquizoíto, em vários tecidos extra-intestinais do gato após a ingestão de oocistos. Os bradizoítos se desenvolvem durante 10 a 15 dias no interior dos cistos, alguns dos quais se rompem liberando essas estruturas, que retornam ao intestino para iniciar o ciclo sexuado, que culmina

com a produção de oocistos. Como o rompimento dos cistos pode ser infrequente, pois depende da dose do inóculo de oocistos, nem todos os gatos eliminarão oocistos.

Os oocistos liberados nas fezes são não esporulados. O processo de esporulação ocorre no ambiente em períodos de um a cinco dias, variação esta relacionada à temperatura e à umidade do local. A viabilidade dos oocistos no meio ambiente também é dependente da temperatura da região. Em climas quentes e úmidos, os oocistos são viáveis por um ano, ao passo que em climas frios essa viabilidade pode se manter por mais tempo (DUBEY; BEATTIE, 1988a).

O período de eliminação de oocistos varia de menos de uma semana a até 21 dias independentemente da forma do parasito inoculada (DAVIS; DUBEY, 1995; DUBEY, 1995; DUBEY, 2002). Muitos fatores podem afetar o período de eliminação e a quantidade de oocistos eliminados pelos gatos, como a idade do animal, seu estado nutricional, a cepa de *T. gondii* utilizada, a forma (taquizoíto, bradizoíto ou esporozoíto) do parasito e a quantidade do inóculo. Dubey e Frenkel (1974) demonstraram que filhotes de faixa etária inferior a 13 semanas eram menos imunes do que gatos adultos, e Dubey, Hoover e Walls (1977), constataram que filhotes recém desmamados eliminavam mais oocistos do que gatos adultos. Assim, de acordo com esses pesquisadores, gatos com menos de um ano de idade eliminam mais oocistos que gatos mais velhos. A cepa P89 é pouco oocistogênica (DUBEY, 1995), ao passo que as cepas VEG, ME49 e TS-2 induzem elevada produção de oocistos, da ordem de até 360 milhões de oocistos (DUBEY, 1996; DUBEY, 2001; DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995b).

O período de eliminação e a quantidade de oocistos eliminados após infecções secundárias são menores do que aqueles determinados pela primo-infecção. Gatos

podem reeliminar oocistos após perder a imunidade intestinal, o que ocorre após alguns anos, segundo Dubey (1995) em 6 anos; a co-infecção com *Cystoisospora felis* (DUBEY, 1976) e a administração de altas doses de corticóide (DUBEY; FRENKEL, 1974) também favorecem a reexcreção. Ainda assim, Lappin et al. (1991) não conseguiram induzir a reelimação de oocistos em gatos com toxoplasmose crônica ou recente, administrando semanalmente doses de 5 ou 20mg/Kg de acetato de metilprednisolona pela via intramuscular (IM) durante 4 semanas.

Portanto, os hospedeiros definitivos podem se infectar pela ingestão de bradizoítos contidos nos cistos teciduais, pela ingestão de oocistos esporulados que contaminam a água ou outros alimentos, pela ingestão de taquizoítos em tecidos de animais na fase aguda da infecção ou, por último, pela via transplacentária (congenita). A infecção mais comum entre os gatos é aquela induzida pela ingestão de cistos teciduais, seja pelo fornecimento de produtos cárneos crus por proprietários não esclarecidos, seja pelo comportamento da espécie que, após o desmame, passa a caçar pequenos roedores e pássaros.

Nos hospedeiros intermediários (mamíferos e aves), a ingestão de oocistos ou cistos teciduais promove a liberação de esporozoítos ou bradizoítos que, ao penetrar o epitélio intestinal e alcançar a lâmina própria, transformam-se em taquizoítos (estruturas de replicação rápida). O taquizoíto penetra na célula hospedeira por processo ativo da membrana celular e torna-se circundado pelo vacúolo parasitóforo, que o protege dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Os taquizoítos se multiplicam assexuadamente por repetidas divisões binárias (endodiogenia), até que a célula hospedeira se rompa. Com o rompimento da célula, os taquizoítos liberados poderão infectar outras células

ou atingir outros tecidos ao ter acesso a circulação sanguínea ou linfática (DUBEY; BEATTIE, 1988a).

Após várias divisões, à medida que o sistema imune do hospedeiro reconhece e combate a infecção, os taquizoítos dão origem ao cisto tecidual, que contém os bradizoítos. Os cistos teciduais crescem lentamente, conforme os bradizoítos se dividem por endodiogenia e permanecem intracelularmente. O tamanho dos cistos teciduais é variável: os mais recentes têm dimensões diminutas, de 5µm de diâmetro, e contendo apenas quatro estruturas, enquanto os mais velhos atingem até 50µm de diâmetro e contêm algumas centenas de bradizoítos. Os cistos teciduais são mais comuns nos tecidos neural e muscular, principalmente o cérebro, o globo ocular e a musculatura esquelética e cardíaca, mas podem ocorrer em outros órgãos, como os rins e o fígado (DUBEY; BEATTIE, 1988a). A localização e o número de cistos teciduais variam de acordo com o hospedeiro e a cepa de *T. gondii*. Em camundongos e ratos, os cistos são mais freqüentes no tecido cerebral do que nas vísceras, independentemente da cepa utilizada. Já em grandes mamíferos (gatos, bovinos, ovinos e caprinos) eles são mais freqüentes na musculatura esquelética do que no tecido cerebral (DUBEY, 1997). Os cistos teciduais intactos não resultam em inflamação e provavelmente não são prejudiciais ao hospedeiro, podendo persistir por toda a vida deste. Essa fase extra-intestinal assexuada do ciclo do parasita também ocorre nos hospedeiros definitivos. Quando o sistema imune do hospedeiro está comprometido os cistos podem voltar à forma replicativa, liberando taquizoítos.

Marsupiais australianos e macacos do Novo Mundo são as espécies animais mais suscetíveis à toxoplasmose, enquanto macacos do Velho Mundo, ratos, bovinos e

cavalos são as espécies mais resistentes à doença (INNES, 1997). Aspectos genéticos, e/ou relacionados à evolução e à ecologia desses animais podem, ainda que parcialmente, explicar essa susceptibilidade.

As infecções induzidas por oocistos, dose independentes, são clinicamente mais severas nos hospedeiros intermediários, à exceção dos herbívoros. Oocistos de *T. gondii* são menos infectantes e patogênicos aos gatos do que aos camundongos e ratos (DUBEY, 1996), enquanto bradizoítos são menos infectantes aos camundongos do que aos gatos (DUBEY, 2001).

O *T. gondii* possui uma estrutura genética conservada que, há aproximadamente 10.000 anos, deu origem a três linhagens bem adaptadas (VOLKMAN; HARTL, 2003; SU et al., 2003). Neste contexto, alta similaridade fenotípica é esperada entre os membros de um mesmo tipo ou linhagem. As cepas de *T. gondii* podem ser classificadas em três tipos genéticos (I, II e III). Grigg et al. (2001) sugeriram que o tipo I, ou cepas recombinantes entre os tipos I e III, estavam relacionados a quadros clínicos oculares de toxoplasmose em humanos. Howe e Sibley (1995) e Howe et al. (1997) relataram que a grande maioria dos casos de toxoplasmose humana (doença) estava associada ao tipo II. Por outro lado, Fuentes et al. (2001) verificaram que o tipo II era mais prevalente em pacientes imunocomprometidos (52%), enquanto o tipo I era mais comum (75%) nos casos de infecção congênita.

Em investigação cuja amostra era constituída por gatos saudáveis provenientes de várias cidades do estado de São Paulo, Pena (2004) encontrou os tipos I e III, e seus recombinantes. No município de Santa Isabel do Ivaí (PR) Dubey et al. (2004) obtiveram 37 isolados de *T. gondii* provenientes de 54 gatos, e identificaram somente os tipos I e III infectando estes gatos, o que difere de estudos realizados nos EUA, que

apontam predominância do tipo II em gatos. Não há estudos que relacionem a frequência dos tipos de *T. gondii* à incidência de doenças em gatos como relatado no homem.

A infecção pelo VIH é uma das principais causas de reativação de *T. gondii*, razão pela qual modelos animais tem sido propostos para estudar a interação entre os dois patógenos (LACROIX et al., 1996). O VIF pertence à mesma família do VIH, *Retroviridae*, e tem sido utilizado no desenvolvimento de um modelo para a SIDA humana. Encontrou-se maior soroprevalência ao *T. gondii* em gatos que também estavam infectados naturalmente pelo VIF (D'AMORE et al., 1997; DORNY et al., 2002, LAPPIN et al., 1993; LUCAS et al., 1998; WITT et al., 1989), embora O'Neil et al. (1991) não tenha confirmado tal evidência.

Os poucos trabalhos experimentais cujo objetivo foi estudar a dinâmica entre o VIF e o *T. gondii* em gatos tentaram obter a reativação do parasito ou o efeito da prévia infecção pelo VIF sobre a resistência frente à primo-infecção com o *T. gondii*. Lappin et al. (1992a) tentaram obter a reativação de *T. gondii* em gatos com evolução crônica assintomática de seis meses, infectando estes animais com o VIF. Não obteve sucesso em induzir a reeliminação de oocistos, os animais se mantiveram em bom estado geral, e houve pequena influência sobre a resposta humoral, exceto pelo aumento de IgM anti-*T.gondii*, sugerindo toxoplasmose ativa, e pela diminuição da blastogênese de linfócitos induzida por antígeno.

Três outros estudos examinaram o impacto da prévia imunodepressão desencadeada pela infecção pelo VIF no curso da infecção primária com *T. gondii* (DAVIDSON et al., 1993; LAPPIN et al., 1996b; LIN; BOWMAN; JACOBSON, 1992b), e

apenas o primeiro e o último concluíram que a infecção pelo VIF poderia favorecer o estabelecimento da toxoplasmose.

Lin, Bowman e Jacobson (1992b) inocularam filhotes com seis semanas de evolução pelo VIF com cistos de *T. gondii*, acompanhando-os por oito semanas. O grupo co-infectado apresentou carga parasitária moderadamente mais alta em encéfalo e linfonodos mesentéricos sugerindo que o VIF facilitaria a disseminação e replicação do *T. gondii*. Por sua vez, Davidson et al. (1993) inocularam taquizoítos em gatos por via intracarotídea: os animais co-infectados desenvolveram doença sistêmica aguda, com mortalidade de 75%, a despeito do tratamento específico. Todos os animais desenvolveram lesões oculares predominantemente corio-retinite.

Lappin et al. (1996b) também inocularam gatos infectados pelo VIF com cistos de *T. gondii*, e não verificaram influência dessa prévia infecção sobre a evolução da infecção toxoplásmica. Clinicamente os animais mantiveram-se normais, e o período de eliminação de oocistos, a conversão e a duração de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* e as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+, ou sua resposta blastogênica frente a antígenos específicos de *T. gondii* não foram influenciados pelo VIF. Os gatos co-infectados apresentaram neutropenia e linfopenia mais intensos durante a inoculação com *T. gondii*, e somente os gatos inoculados com *T. gondii* apresentaram linfocitose na fase de recuperação.

Vários testes sorológicos estão disponíveis para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Teste de Aglutinação Modificado (TAM), o Teste de Aglutinação em Látex (TAL), o Teste de Hemaglutinação Indireta (THI), o Teste do Corante (TC), o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Destes, o TAL e o THI possuem baixa sensibilidade e o TC é mais específico em humanos do que

em gatos (DUBEY; THULLIEZ, 1989). A cinética de anticorpos IgM e IgG também tem sido avaliada em gatos natural e experimentalmente infectados com o *T. gondii* pelo ELISA e a RIFI (LAPPIN et al., 1989; LAPPIN et al., 1992a; LIN; BOWMAN; JACOBSON, 1992b; OMATA et al., 1990). Desmonts e Remington (1980) modificaram o teste de aglutinação Direta (TAD) pela adição de 2-mercaptoetanol, que destrói a IgM, padronizando assim, o TAM. Desde então esse teste tem sido utilizado também para o diagnóstico da toxoplasmose em animais, inclusive em gatos (DUBEY; BEATTIE, 1988a).

A produção de IgM após a infecção toxoplásmica tem início na primeira semana e os títulos se mantêm, em geral, até a 7ª spi (semana pós-infecção) ou menos (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995b). A infecção pelo VIF parece interferir no início da síntese de IgM, retardando o processo (LIN; BOWMAN; JACOBSON, 1992b), e influenciando no período em que os títulos se mantêm, pelo retardo na troca de classe de imunoglobulina M para G (TORTEN et al., 1991). Diante desses fenômenos, a detecção de IgM sérica anti-*T. gondii* em gatos infectados pelo VIF nem sempre se correlaciona à infecção ativa ou aguda (LAPPIN et al., 1993).

O desenvolvimento de IgG anti-*T. gondii* tem início entre a 1ª e a 3ª spi após a infecção primária (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995b; LIN; BOWMAN, 1991; OMATA et al., 1990), e tendem a manter altos títulos durante vários meses (DUBEY, 1995; DUBEY; THULLIEZ, 1989; LIN; BOWMAN; JACOBSON, 1992b; LAPPIN et al., 1996b). A detecção desses anticorpos e do período de soroconversão pode ser afetada pelo teste sorológico utilizado. Utilizando o TAM com antígeno fixado em acetona, Dubey e Thulliez (1989) encontraram queda abrupta dos títulos dois meses após a primo-

infecção, o que não ocorreu quando empregaram o TAM com antígeno fixado em formalina e o TC.

Supõe-se que a IgM, a IgA e a IgG séricas anti-*T. gondii* não têm influência sobre o período de eliminação de oocistos. Para avaliar a cinética da resposta humoral dessas imunoglobulinas frente ao período de eliminação de oocistos, Omata et al. (1990) inocularam um grupo de gatos com cistos, e outro com oocistos de *T. gondii*. Quando os gatos receberam cistos de *T. gondii* como inóculo, o pico de IgM e a ascensão dos picos de IgA e IgG coincidiram com o final do período de eliminação de oocistos. Já Kaneko et al. (2004) evidenciaram *in vitro* que a IgM natural e anti-*T. gondii* felina não é capaz de ativar o complemento pela via clássica e destruir taquizoítos, como ocorre em outras espécies. Quando Omata et al. (1990) forneceram aos gatos oocistos como inóculo, surpreendentemente o período de eliminação de oocistos foi precedido por picos séricos de IgM e IgA, e coincidiu com a ascensão dos picos séricos de IgG. Posteriormente, Omata et al. (1997) demonstraram que a produção local de IgA e IgG no intestino felino confere imunidade contra taquizoítos de *T. gondii*. A IgA secretada reconhecia vários antígenos de taquizoítos e um de esporozoíto.

A apresentação clínica da toxoplasmose em gatos depende de fatores relacionados ao hospedeiro (idade em que ocorre a infecção, estado imunitário, doenças concomitantes) e ao parasito (cepa, forma infectante, dose do inóculo, vias de inoculação).

As alterações associadas à toxoplasmose felina incluem anorexia, tosse, dispnéia, taquipnéia, febre, apatia, vômito, diarreia, icterícia, sintomas de encefalite, alterações oftalmológicas e morte súbita (DUBEY; LAPPIN, 1998). Os relatos de toxoplasmose felina (doença), com manifestações clínicas, são relativamente escassos

(DUBEY; CARPENTER, 1993; LAPPIN et al., 1989; LAPPIN, 1996) quando cotejados com a prevalência sorológica da infecção felina no mundo todo (DUBEY; BEATTIE, 1988a).

Os sintomas neurológicos decorrentes da infecção do Sistema Nervoso Central (SNC) pelo *T. gondii* em gatos incluem hipotermia, cegueira parcial ou total, alterações de comportamento, estupor, incoordenação motora, prurido auricular exacerbado, andar em círculos, anisocoria e convulsões (DUBEY; CARPENTER, 1993; DUBEY; LAPPIN, 1998).

Gatos também podem ser infectados pelo *T. gondii* *in útero*, pela via transplacentária, ou durante o aleitamento (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995a; POWELL; LAPPIN, 2001). Animais infectados dessa maneira podem ter curso fatal da doença, desenvolver quadros oculares, mais freqüentemente corio-retinite nesta fase da vida, ou se desenvolver sem qualquer comprometimento orgânico.

Dubey, Lappin e Thulliez (1995a) conseguiram infectar 26 de 40 filhotes de gatas infectadas durante a gestação em 1 a 21 dias antes do parto. A maioria dos 26 gatinhos infectados vieram a óbito em decorrência da replicação de taquizoítos em tecidos pulmonares e no fígado. Powell e Lappin (2001) inocularam 5 fêmeas felinas gestantes utilizando 3 cepas diferentes de *T. gondii* (ME-49, Mozart e Maggie). Os autores encontraram diferenças na virulência dessas cepas em produzir doença ocular sem outro comprometimento orgânico. As lesões em fundo de olho associadas à cepa Mozart tendiam a ser maiores e mais exsudativas do que aquelas associadas às cepas ME-49 e Maggie. Interessantemente, apenas os filhotes nascidos de mães infectadas com a cepa Mozart desenvolveram títulos de anticorpos detectáveis. Em 13 de 21 filhotes estudados, a corio-retinite foi a manifestação primária, e parece preponderar no

período neonatal, embora dois casos de uveíte anterior transitória tenham sido identificados. Já em gatos adultos, os quadros de uveíte anterior são mais freqüentes.

Os sintomas associados à toxoplasmose felina estão relacionados principalmente a alterações dos sistemas respiratório, digestivo, ocular e nervoso (DUBEY; CARPENTER, 1993; DUBEY; LAPPIN, 1998), determinadas pela replicação do agente. Essas alterações podem promover ruptura celular, necrose associada a reações de hipersensibilidade tardia e vasculite pela deposição de imunocomplexos (LAPPIN et al., 1989).

Em estudo retrospectivo de 100 casos de toxoplasmose felina (doença), Dubey e Carpenter (1993) verificaram que 36 apresentavam quadros generalizados, 26 tinham lesões predominantemente pulmonares, 16 apresentavam lesões envolvendo os órgãos abdominais, 2 tinham envolvimento apenas do fígado, 7 envolvendo o SNC e 9 casos de toxoplasmose neonatal. Quadros oculares foram constatados em 22 dos 27 gatos em que se havia material ocular para ser analisado, e todos estavam associados a quadros generalizados ou sistêmicos, tendo como lesão predominante a iridociclocoroidite multifocal (81,8% dos casos).

Geralmente, o diagnóstico da toxoplasmose felina doença se faz no *post-mortem* mediante a identificação dos taquizoítos responsáveis por lesões nos tecidos analisados. *In vivo*, o diagnóstico baseia-se na associação entre os dados do histórico, os sintomas e a cinética dos testes sorológicos e a resposta favorável à terapia específica. Quando há manifestações oculares, principalmente em casos de uveíte anterior, além dessa estratégia clínica outros procedimentos laboratoriais, como a detecção de IgM no humor aquoso (HILL et al., 1995; LAPPIN et al., 1992c; LAPPIN, 1996); e a amplificação de material genético específico de *T. gondii* (BURNEY et al.,

1998; LAPPIN et al., 1996a; STILES; PRADE; GREENE, 1996) podem auxiliar no estabelecimento da etiologia do quadro. No entanto, como demonstrado em vários experimentos, gatos inoculados com *T. gondii* podem permanecer por muito tempo em parasitemia, inclusive evidenciada indiretamente no humor aquoso, sem mostrar qualquer sintoma de acometimento orgânico ou inflamação ocular (BURNEY et al., 1998; BURNEY et al., 1999; LAPPIN et al., 1996a; LIN; BOWMAN; JACOBSON, 1992a; STILES; PRADE; GREENE, 1996;).

Além do *T. gondii*, outros agentes infecciosos, inclusive em associação, podem determinar quadros inflamatórios oculares (uveíte) (LAPPIN et al., 1989). Alguns autores sugerem que a associação entre agentes, *T. gondii* e Vírus da Imunodeficiência Felina, poderia produzir um quadro mais agressivo ocular e sistêmico (DAVIDSON et al., 1993). É clara a relação existente entre o *T. gondii* e o desenvolvimento de uveíte anterior e corio-retinite em gatos com toxoplasmose sistêmica ou generalizada (DAVIDSON et al., 1993), mas seu papel em quadros localizados de uveíte anterior permanece controverso, embora evidências sorológicas indiretas indiquem ser esse o principal agente desencadeador (LAPPIN et al., 1992b), em virtude da maior frequência de detecção de IgM (HILL et al., 1995; LAPPIN et al., 1992c; LAPPIN, 1996) e material genético do parasito no humor aquoso (BURNEY et al., 1998; LAPPIN et al., 1996a; STILES; PRADE; GREENE, 1996), além da resposta favorável ao tratamento específico (LAPPIN et al., 1989).

A patogênese da toxoplasmose ocular humana é classicamente descrita como um efeito citotóxico direto determinado pelo agente, pois novas lesões freqüentemente se desenvolvem de forma adjacente às cicatrizes em retina determinadas pelo *T. gondii* (lesões satélite) (DUBEY; BEATTIE, 1988b). No entanto, a demonstração da presença

do agente é difícil mesmo por técnicas de biologia molecular, como a PCR (DE BOER; VERHAGEN; BRUINENBERG, 1996). Sugere-se que em alguns casos, o quadro ocular pode ser resultante da hipersensibilidade contra auto-antígenos na retina (antígeno S) (NUSSENBLATT; BELFORT, 1994). Em gatos não há lesão patognomônica no segmento posterior como ocorre no homem, e parece que a patogênese da inflamação ocular em felinos seja bem diferente da que ocorre em humanos (DAVIDSON; ENGLISH, 1998).

No homem, acredita-se que a presença do *T. gondii* na retina inicie o processo inflamatório no segmento posterior. Os quadros de uveíte anterior podem estar associados, e em geral são secundários à liberação de mediadores inflamatórios no segmento posterior e não consequência do efeito direto do agente, pois é rara a circunstância em que se encontre evidência da presença do agente na câmara anterior (NUSSENBLAT; BELFORT, 1994). Estudos experimentais de toxoplasmose aguda em gatos sugerem que as lesões em retina e coróide sejam resultantes do efeito direto do agente (DAVIDSON *et al.*, 1993), à semelhança do que é proposto no homem, embora em gatos não seja descrita a recorrência dos focos inflamatórios oculares relatada em humanos. A patogênese da uveíte anterior observada em gatos com evidência sorológica de toxoplasmose não está bem definida. Como o agente é raramente encontrado na íris e no corpo ciliar, aventa-se a hipótese de que ele induziria um processo inflamatório imunemediado, sem ser capaz de induzi-lo diretamente.

Alguns mecanismos de inflamação imunemediada têm sido propostos, inclusive o direcionamento de linfócitos ativados ao tecido ocular (“homing”), o mimetismo molecular ou antigênico (o *T. gondii* possuiria antígenos semelhantes aos da úvea), e a formação de imunecomplexos em outros tecidos extra-oculares e com deposição na

úvea (DAVIDSON; ENGLISH, 1998). É também possível que a alta soroprevalência ao *T. gondii* e a uveíte anterior em gatos não guardem relação entre si, refletindo apenas um risco compartilhado para a exposição ao agente e o desenvolvimento do quadro ocular (DAVIDSON; ENGLISH, 1998).

Como, à semelhança do VIH-1, o VIF também infecta macrófagos, é possível supor que ele interferiria no processamento e na apresentação de antígenos por essas células, influenciando a resposta imune a outros patógenos. Para investigar essa suposição, Lin e Bowman (1992) estudaram a função de macrófagos peritoniais felinos oriundos de gatos infectados com o VIF (14 semanas de evolução) e co-infectados com o *T. gondii* (8 semanas de evolução). A infecção pelo VIF por si só diminuiu a secreção de IL (interleucina)-1 por tais macrófagos, mas também aumentou sua atividade antimicrobiana. A infecção toxoplásmica concomitante não interferiu nestes parâmetros. Como a IL-1 é necessária para a apropriada resposta de linfócitos T a mitógenos e antígenos, explica-se porque alguns autores Davidson et al. (1993); Lappin et al. (1992a) e Lin, Bowman e Jacobson (1992b) encontraram limitada resposta mitogênica de linfócitos T em gatos infectados pelo VIF. Lappin et al. (1992a) não verificaram alteração na resposta mitogênica de linfócitos de gatos infectados com *T. gondii*, Davidson et al. (1993) observaram resposta mitogênica diminuída à concavalina-A em gatos co-infectados apenas na 1ª spi, situação que se normalizou na 4ª e 6ª spi. Lappin et al. (1993) e Lin, Bowman e Jacobson (1992b) encontraram respostas mitogênicas diminuídas aos antígenos no grupo de gatos co-infectados, o que poderia favorecer a replicação do parasito. Por outro lado, Lappin et al. (1996b) não encontraram diferenças significantes na resposta mitogênica a antígenos de *T. gondii* e à concavalina-A nos grupos de gatos infectados e não infectados pelo VIF e/ou *T. gondii* durante o período

de 154 dias do experimento. Lin e Bowman (1992) levantam a hipótese de que a infecção toxoplásmica em gatos infectados pelo VIF poderia funcionar como um co-fator para aumentar a imunodeficiência decorrente do VIF pelo aumento da produção de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral – alfa). A produção de TNF- α pelo macrófago felino aumentaria a ativação do vírus em linfócitos, aumentando a disfunção de linfócitos T CD4+, o que permitiria maior replicação do parasito.

Geralmente, a evolução clínica da infecção pelo VIF é longa, de anos (BURKHARD et al., 2002), e é parcialmente dependente do tipo do vírus. O vírus do clade A apresenta virulência e carga viral baixas (PEDERSEN et al., 2001), ao passo que o vírus do clade B possui maior tropismo por monócitos e macrófagos, induz inversão mais rápida da relação CD4/CD8 e imunodeficiência clínica (DOW et al., 1999; BURKHARD et al., 2002). Pedersen et al. (2001) observaram que o clade C é mais virulento que o clade A, apresentando neutropenia e linfopenia mais intensas e carga viral mais alta durante a fase aguda da infecção. A via de inoculação, o clade e a dose infectante podem influenciar a magnitude da carga viral que se desenvolve no hospedeiro, conforme observado por Burkhard et al. (2002) ao inocular gatos com os clades A e B pela via vaginal e pela via IV.

A semelhança da infecção humana, a infecção pelo VIF pode ser dividida em cinco estágios seqüenciais (ISHIDA; TOMODA, 1990). A fase aguda que se segue à infecção pode passar despercebida na maioria dos animais. Alguns gatos infectados apresentam linfadenomegalia transitória, febre, depressão e anorexia no período de uma a quatro semanas ou mais. Segue-se um período de meses a anos em que a infecção se mantém assintomática. Linfadenopatia generalizada, febre, anorexia,

perda de peso e alterações comportamentais são vistas com frequência com a progressão da infecção, nas fases denominadas de Linfadenomegalia Generalizada e do Complexo relacionado à FAIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida Felina). Infecções crônicas secundárias ou associadas, causadas por agentes infecciosos banais ou patogênicos, são comuns nessas fases. Finalmente, instala-se a síndrome de imunodeficiência felina adquirida, na qual podem estar presentes infecções secundárias, desordens neurológicas, oculares ou neoplasias. Uveíte anterior, conjuntivite crônica e linfoma ocular são algumas alterações oculares que podem ser encontradas em gatos infectados pelo VIF (WILLIS, 2000).

Historicamente, o foco para a importância da compreensão das consequências de co-infecções para a imunidade foi consequência da epidemia de SIDA e do descobrimento da dicotomia da resposta imune Th (T auxiliar) 1/Th2 frente aos patógenos (MOSIER, 1994). Já é sobejamente conhecido que pessoas infectadas com o VIH-1 mantêm-se assintomáticas até que os valores de linfócitos T CD4+ declinem abaixo de $200-300^{-mm^3}$, momento no qual o aparecimento de infecções oportunistas ocorre, dentre elas a toxoplasmose (CROWE et al., 1991). Em gatos, também se observa a lenta e progressiva perda, principalmente de linfócitos T CD4+, com a consequente inversão da relação CD4/CD8 (DEAN et al., 1996; LAPPIN et al., 1992a; REUBEL et al., 1994; TORTEN et al., 1991). Em decorrência de tal fenômeno, é óbvio que este tipo celular deve ter um papel chave na defesa contra os agentes oportunistas, mas a análise sobre outras alterações dos mecanismos de defesa imune específicos e inatos contribui para a melhor compreensão do panorama da intrincada relação entre tais retrovírus e outros patógenos associados sobre o sistema imune.

Todo processo infeccioso inicialmente estimulará os mecanismos de defesa inata do sistema imune, e o efeito resultante da interação entre os agentes e esses elementos do sistema determinará a evolução do processo: eliminação do agente, persistência do agente sob a forma latente ou crônica, bem como susceptibilidade a outros patógenos.

A citocina IFN- γ (Interferon - gama), sintetizada por células NK, tem importância capital na determinação da resistência contra a infecção toxoplásmica (SHER et al., 1993; SUZUKI et al., 1988), tanto por aumentar a atividade microbicida de macrófagos quanto por iniciar a ativação de linfócitos T CD4⁺ Th1 e CD8⁺. Experimentos em camundongos demonstraram que o bloqueio da função do TNF- α e do IFN- γ por meio de anticorpos monoclonais, aumentou a mortalidade dos animais frente à infecção toxoplásmica, enquanto o bloqueio das IL-6 e IL-10 aumentou-lhes a sobrevivência (HUNTER et al., 1993). Scharton-Kersten et al. (1995) e Wolf et al. (1991) mostraram a importância da IL-12 em induzir a produção de TNF- α pelos macrófagos e a secreção de IFN- γ pelas células NK.

Ao infectar macrófagos, o *T. gondii* pode estimulá-los a produzir IL-12 e TNF- α , que por sua vez estimularão células exterminadoras naturais (NK) a produzir IFN- γ . O IFN- γ estimulará os macrófagos a produzir radicais livres do oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio, que inibirão a replicação do parasito. Esse mecanismo da imunidade descreve a resistência independente de linfócitos T para o *T. gondii* (HUNTER et al., 1993).

A imunidade protetora contra o *T. gondii* no modelo murino de toxoplasmose é mediada principalmente pela resposta imune celular mediada desencadeada pela IL-12

e IFN- γ , o que também deve ocorrer em outras espécies (GAZZINELLI et al., 1992; KHAN; MATSURA; KASPER, 1994; WOLF et al., 1991). Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, células NK e macrófagos ativados produzem IFN- γ , que ativam macrófagos para eliminar agentes infecciosos intracelulares. Koyama et al. (1999) demonstraram o aumento na produção de RNA mensageiro de IL-12 e IFN- γ no baço e nos linfonodos mesentéricos após a infecção primária de gatos com *T. gondii*. Na exposição secundária ao agente, os autores observaram novo aumento dessas citocinas e também de IL-4, que não havia ocorrido anteriormente. A IL-4 está envolvida na indução da imunidade humoral e no aumento da produção de anticorpos específicos contra o parasito após a reexposição.

Dean e Pedersen (1998) estudaram o efeito da fase aguda da infecção (4 meses) pelo VIF sob o perfil de citocinas produzidas em vários órgãos linfóides primários e secundários. Em geral, as citocinas relacionadas à resposta Th2 (IL-4 e IL-10) estavam aumentadas em maior nível do que aquelas relacionadas à resposta Th1 (IL-12 e IFN- γ). Entre os órgãos linfóides analisados (timo, baço, linfonodos cervicais e mesentéricos), os linfócitos T CD4⁺ eram a fonte primária de IL-2, IL-4, IL-10; tanto os linfócitos T CD4⁺ quanto os CD8⁺ produziam IFN- γ , e nenhuma citocina sintetizada pelos linfócitos B foi identificada. A natureza e a intensidade das respostas de citocinas diferiram entre os órgãos linfóides analisados, demonstrando a natureza heterogênea do perfil de citocinas em gatos infectados pelo VIF durante a fase aguda da infecção. Esses achados demonstram que não há uma dicotomia clara entre a predominância de uma resposta Th sobre a outra, embora ocorra maior síntese de citocinas relacionadas à resposta Th2, conforme observado em humanos infectados com o VIH (GRAZONI et

al., 1994). Chougnnet et al. (1996) também encontraram, em indivíduos infectados com o VIH, maior produção de IL-10, o que poderia explicar os baixos níveis de IL-12.

Após a fase aguda da infecção por esse vírus, a produção de citocinas tende a decrescer ao valor basal ou a valores inferiores àqueles apresentados por animais não infectados, conforme observação de Kipar et al. (2004), que verificaram que os monócitos de gatos assintomáticos, infectados com uma cepa de baixa virulência do VIF, com 9,5 meses de infecção, apresentavam transcrição diminuída para IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-1 β e TNF- α . Em gatos infectados pelo VIF sintomáticos, a expressão de IL-10, IL-6 e TNF- α em macrófagos alveolares e linfonodos estava aumentada, mas era deprimida em infecções crônicas assintomáticas (RITCHEY et al., 2001). Levy et al. (1998) também não encontraram diferenças nos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-12p40 e TNF- α entre gatos infectados com o VIF com 16 semanas de evolução e gatos não infectados, mas discorda com relação às citocinas IL-10 e IFN- γ , onde o aumento de suas expressões já na fase aguda da infecção não seria pontual mas se manteria mesmo na fase assintomática da infecção sugerindo que a alteração no perfil de citocinas referente às resposta Th1 e Th2 já estaria presente na fase aguda da infecção, antes do desenvolvimento de doença clínica, permanecendo estável durante o curso da infecção.

A heterogeneidade da população de gatos analisada, além da diferença na magnitude da carga viral, a utilização de diferentes cepas do vírus, os estágios de progressão da doença (fase aguda X fase assintomática X fase de FAIDS) e a exposição simultânea a outros patógenos podem tornar difícil a comparação entre os resultados destes trabalhos.

Ao inocular gatos infectados com o VIF com 16 semanas de evolução com *T. gondii*, Levy et al. (1998) verificaram aumento dos níveis de expressão de RNA mensageiro de IL-10, enquanto no grupo controle não infectado com o VIF essa citocina não foi expressa em níveis aumentados, embora a expressão de IL-2 e IL-12 tenha aumentado. Em ambos os grupos houve aumento da expressão de IFN- γ . O tipo celular responsável pelo aumento dos níveis de IL-10 foi o linfócito T CD8+, o que também fora observado em humanos infectados com o VIH (GRAZIONI et al., 1994). A IL-10 atua diretamente em linfócitos, impedindo a ativação da via co-estimulatória de CD28, o que inibe a sua proliferação e a síntese de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ) da resposta Th1 e Th2 (JOSS et al., 2000). Fica claro que a infecção pelo VIF frente a infecção toxoplásmica, alterando a resposta imune Th1, que é requerida em maior magnitude nessa infecção, pode favorecer a replicação mais intensa do parasito, induzindo quadros clínicos mais graves.

Levy et al. (2004) novamente corroboraram seus achados de 1998. Eles analisaram o perfil de expressão de citocinas em gatos infectados com o VIF com 6 meses de evolução, quando os animais foram infectados com *T. gondii*. Antes da infecção toxoplásmica, as citocinas IL-10 e IFN- γ possuíam expressões aumentadas, enquanto as citocinas IL-2 e IL-12 estavam diminuídas em relação ao grupo controle. Após a infecção toxoplásmica, os gatos do grupo controle demonstraram aumento na expressão das citocinas analisadas (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ), enquanto os gatos co-infectados tiveram a expressão de IL-2, IL-6, IL-12 e IFN- γ suprimida, mas os níveis de IL-10 permaneciam altos, no mesmo patamar em que se encontravam anteriormente à inoculação. A produção de IL-10 ocorreu tanto por linfócitos T CD4+ quanto CD8+.

Com a evolução do quadro determinado tanto pelo VIH quanto pelo VIF, ocorre uma predominância de linfócitos T CD8⁺ (GRAZIONI et al., 1994; LEVY et al., 2004; LEVY et al., 1998), que muito provavelmente são os responsáveis pela secreção em altos níveis de IL-10 e IFN- γ . Esses linfócitos T CD8⁺ possuem fenótipo de ativação CD8 β CD62L^{negativo} Integrina^{alto} com caráter supressor (CRAWFORD et al., 2001; GEBHARD et al., 1999; INOUE et al., 1993), o que poderia explicar a susceptibilidade destes gatos a outros patógenos. Diferentemente, linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e não supressores são necessários para impedir a reativação da infecção crônica determinada pelo *T. gondii* no modelo murino (GAZZINELLI et al., 1992; SUBAUSTE; KONIARIS; REMINGTON, 1991), e também para o controle da replicação pelo VIF (FLYNN et al., 2002; SHIMOJIMA et al., 2003).

A crônica estimulação antigênica determinada por qualquer agente infeccioso pode, por si só - pela estimulação crônica de linfócitos T e B via CD70-CD27 - levar à produção de linfócitos efetores e de memória, e à consequente depleção de linfócitos “naive”, conforme demonstrado em modelo murino por Tesselaar et al. (2003).

A maior susceptibilidade de gatos e humanos infectados por esses retrovírus ao *T. gondii* poderia ser o resultado da prejudicada produção de IL-12 por linfócitos T CD4⁺, pela predominância de uma subpopulação de linfócitos T CD8⁺ com perfil supressor, da função alterada de macrófagos e células dendríticas, bem como da menor resposta quantitativa e qualitativa de células NK.

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

O estudo experimental contemplou uma amostra constituída por 24 gatos (*Felis catus*) adultos, de faixa etária compreendida entre 18 e 22 meses, 12 machos e 12 fêmeas, todos castrados e instalados no Gatil do Centro de Estudos de Doenças de Cães e Gatos do Departamento de Clínica Médica (VCM) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Dos 24 animais que constituíram a amostra, 14 estavam infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (VIF) há doze meses, e 10 não haviam sido infectados por esse vírus. A infecção pelo VIF foi confirmada pela pesquisa de anticorpos específicos pelo método de imunoadsorção (SNAPP Combo[®] - IDEXX Laboratories) em duas ocasiões, e pela técnica de nested-PCR, realizada no Laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu (ZANUTTO et al., [2005]) (em fase de elaboração)¹.

Todos os gatos, inclusive aqueles infectados pelo VIF, apresentavam-se em boas condições de saúde, foram imunizados contra as principais doenças infecciosas dos felinos (Raiva, Panleucopenia, Calicivirose, Rinotraqueíte e Clamidiose felinas Eclipse-4[®] Fort Dodge) e eram vermifugados semestralmente. A dieta desses animais era constituída por alimento industrializado (Friskies[®] - Nestlé), e todos eles tinham livre

¹ ZANUTTO, M. S.; HAGIWARA, M. K.; FROES, T.; TEIXEIRA, A. L. Caracterização clínica da fase aguda da infecção de felinos pelo Vírus da Imunodeficiência Felina. A ser editado pela Ciência Rural, [2005]

acesso ao solário até o momento do experimento. Como preventivo contra infestações por pulgas, todos recebiam aplicações tópicas mensais de fipronil (Frontline® - Merial).

Durante o experimento os animais foram mantidos isolados, em gaiolas individuais (Apêndice A). Aqueles que receberam inóculo de *T. gondii* permaneceram isolados dos demais grupos. Após a inoculação, todas as gaiolas, comedouros, bebedouros, bandejas sanitárias e o recinto da sala foram higienizados com vapor de água a 100°C diariamente.

Quatro Grupos experimentais foram constituídos por sorteio:

Grupo I: Gatos VIF – positivos (n= 7)

Grupo II: Gatos VIF – positivos (n= 7)

Grupo III: Gatos VIF – negativos (n= 7)

Grupo IV: Gatos VIF – negativos (n= 3)

Os felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) receberam encéfalo, musculatura e vísceras (Apêndice B) de dois camundongos, contendo cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* (Apêndice C) como inóculo, após jejum alimentar prévio de 36 horas. Os felinos dos Grupos II (VIF+TOXO-) e IV (VIF-TOXO-) não foram infectados, e constituíram o controle da infecção toxoplásmica.

Todos os animais foram submetidos a exame clínico antes do experimento. Durante o período experimental, tais exames foram realizados diariamente, por 12 semanas. Os exames oftalmológicos eram implementados quinzenalmente, ou quando se fizessem necessários. As fezes dos felinos dos Grupos I e III foram coletadas *in totum* diariamente, até sete dias após a cessação da eliminação de oocistos, em todos os gatos infectados pelo *T. gondii*.

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular, com os animais em jejum de doze horas e após rigorosa assepsia, antes da inoculação, nos dias 3, 5 e 7 pós-inoculação (pi) e depois, semanalmente, durante doze semanas. Para quantificar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, procedeu-se à realização do hemograma e da citometria de fluxo, colocando alíquotas do sangue em tubos contendo EDTA-K₃ (sal tripotássico do ácido etilenodiaminotetracético) a 7,5% (Vacutainer[®], Benton Dickinson). O sangue restante foi disposto em tubos de vidro siliconizados contendo gel ativador de coágulo (Vacutainer[®], Benton Dickinson). Após a retração do coágulo, os tubos foram centrifugados e o soro obtido foi congelado a -20°C até a realização da prova sorológica. Quando da colheita também foram preparados esfregaços de sangue sem anticoagulante (dois para cada animal), secos ao ar e preservados em temperatura ambiente até o momento do processamento.

Para a obtenção de soro destinado à titulação de anticorpos, as amostras foram colhidas desde o nascimento dos animais e a cada dois meses, no 3º, 5º e 7º dpi (dia pós-inoculação), e semanalmente até a 12ª spi (semana pós-inoculação). Os animais selecionados para o experimento nasceram de mães não reagentes à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

3.2 Preparo do inóculo de *Toxoplasma gondii*

Dois gatos (animais A e B) jovens (3 e 4 meses de idade) foram mantidos no Biotério do Departamento de Prevenção e Saúde da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, para a obtenção de oocistos frescos. Esses animais receberam

tecidos crus (encéfalo, musculatura e vísceras) de um camundongo Suíço Albino infectado com a cepa P de *T. gondii*. A cepa P foi gentilmente cedida pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os dois animais foram submetidos a exame físico diário, e todas as fezes por eles produzidas até sete dias após o término do período de eliminação de oocistos foram recolhidas. Para a obtenção do soro e pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgG e IgM, o sangue de ambos foi colhido por venopunção jugular no 6º, 10º, 15º, e 27º dpi e processado pela técnica de RIFI.

As amostras de fezes contendo oocistos de *T. gondii* foram estocadas sob refrigeração, e aquelas que continham oocistos na concentração subjetiva de quatro a cinco cruces (Apêndice D) foram homogeneizadas com água destilada, peneiradas em tamis com malha de 0,210 e 0,075mm para a retirada de detritos, e mantidas por dois dias em cálices de sedimentação, em repouso e sob refrigeração. Todo o sobrenadante foi descartado, e a 4mL do precipitado foram adicionados 36mL de solução de sacarose para a obtenção dos oocistos pela técnica de flutuação. Para a esporulação dos oocistos, 8mL do sobrenadante foram transferidos para potes de vidro, cada um dos quais recebeu 80mL de solução de ácido sulfúrico a 2%. Esses potes foram mantidos em estufa a 27°C por 10 dias, quando se observou a esporulação dos oocistos. O conteúdo dos recipientes foi centrifugado a 1.000xg por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em solução fisiológica e quantificado em câmara de Neubauer. Foram preparados inóculos com concentrações de oocistos diferentes: 60, 30 e 15 oocistos, respectivamente.

Cento e vinte camundongos da linhagem Suíço Albino, de ambos os sexos, com 44 dias de idade, receberam o inóculo através de sonda gástrica (Apêndice E): 40

camundongos receberam quinze oocistos, 40 receberam trinta oocistos e 40 receberam sessenta oocistos.

Três dias após a inoculação, iniciou-se o tratamento dos camundongos, constituído por sulfadiazina na dose de 15mg/Kg (0,375mg por camundongo) em volume de 75µL de água destilada, em intervalos de 12 horas, durante 7 dias. Cinco dias após o término do tratamento observou-se aumento na mortalidade dos animais, e um novo ciclo terapêutico, individual e com adição do antibiótico na água de bebida, foi iniciado. Houve óbito de 69 camundongos, com sintomas que variaram de retardo de crescimento, pelame eriçado, secreção ocular purulenta, aumento de volume abdominal (ascite) e incoordenação motora a cabeça pendente.

Depois de quatro semanas de inoculação, 28 camundongos foram sacrificados (14 inoculados com 60 oocistos e 14 inoculados com 30 oocistos). Cada gato dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) recebeu como inóculo dois camundongos (um inoculado com 60 oocistos, e outro com 30 oocistos, respectivamente). Inicialmente foi fornecido o cérebro e, após a sua ingestão, o restante da carcaça (musculatura e vísceras).

3.3 Quantificação de oocistos

A pesquisa e a quantificação de oocistos de *T. gondii* foram realizadas no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP. As amostras de fezes diárias foram pesadas e submetidas ao exame coproparasitológico pela técnica de flutuação em solução de sacarose. Aquelas nas quais a presença de oocistos foi identificada foram avaliadas

pela técnica modificada de Dubey (2001), para a quantificação de oocistos no volume fecal total. Todo o volume fecal diário foi pesado e, a cada 10g de fezes, adicionaram-se 40mL de solução de sacarose (Anexo A), proporção que foi mantida para volumes fecais menores. As fezes foram homogeneizadas com a solução de sacarose, e posteriormente peneiradas para a retirada de detritos e de pêlos. A amostra foi centrifugada a 1200xg. Com o auxílio de alça flambada foi retirada uma gota do preparado da região do menisco, que foi depositada em uma lâmina coberta com lamínula e examinada em microscópio óptico em aumentos de 10 e 40X, para investigar a presença de oocistos. Detectada a presença de oocistos em pelo menos uma das lâminas examinadas, todo o sobrenadante foi recolhido em tubos Falcon de 50mL, em alíquotas de 10mL, completando-se o volume com 40mL de solução fisiológica (NaCl) a 0,9%. Os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 1.200xg, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi recolhido em um único tubo de 50mL, ao qual adicionou-se ácido sulfúrico a 2% até completar o volume. O preparado foi mantido sob refrigeração até o momento da contagem de oocistos, que foi realizado em menos de uma semana.

Foram depositados 10 μ L da solução final em hemocitômetro, e procedeu-se à contagem de oocistos nos quatro quadrantes (área total de leucócitos). O número obtido foi multiplicado pelo fator da câmara (2.500) e pelo volume do processamento final de fezes totais (50). O valor mínimo de oocistos identificados na câmara é de um (01) oocisto. A sensibilidade da técnica foi de 125.000 oocistos, ou seja, 01 (número de oocistos) x 2.500 (fator) x 50 (volume final), obtendo-se 125.000.

3.4 Reação de Imunofluorescência Indireta

A Reação de Imunofluorescência Indireta para a pesquisa de anticorpos anti-IgG e IgM de *T. gondii* foi realizada no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP.

Utilizou-se antígeno liofilizado de *T. gondii* ImunoToxo® (Biolab Diagnóstica), obtido de lavado peritoneal de camundongos albinos, que foi reconstituído pela adição de 1,0mL de água destilada ao material liofilizado. Subseqüentemente, uma gota do antígeno foi depositada em cada uma das áreas demarcadas nas lâminas para microscopia de fluorescência (Perfecta nº 5), previamente lavadas e desengorduradas. As lâminas foram secas em estufa a 37°C, acondicionadas em laminário e mantidas a – 20°C até o momento do uso. O conjugado anti-IgG felino empregado na RIFI foi preparado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP. Já o conjugado anti-IgM felino (VRMD) foi adquirido comercialmente, pronto para uso. Como controles positivo e negativo foram utilizados soros de gatos com títulos de IgM e de IgG e sem título de anticorpos, respectivamente.

As lâminas com o antígeno e as amostras de soro armazenadas foram retirados do “freezer” no momento da realização das reações. Cada amostra de soro foi diluída com solução tampão PBS, pH 7,2 (Anexo B), em progressão geométrica de razão dois, a partir de 1:16 até 1:64. Se necessário, novas diluições sucessivas, até 1:2.048, eram realizadas. Uma gota de cada diluição do soro foi depositada na lâmina previamente preparada, a qual foi colocada em estufa a 37°C, em câmara úmida por 45 minutos,

lavada sucessivamente por três vezes com PBS, pH 7,2, e mantida imersa na solução tampão durante 5 minutos. A seguir, o excesso de tampão foi retirado com papel filtro e a lâmina foi mantida em temperatura ambiente até a secagem completa. Uma gota do conjugado antigamaglobulina G diluído a 1:40 em PBS, pH 7,2 ou uma gota do conjugado anti-IgM foi depositada sobre cada área de reação, repetindo-se a seqüência de incubação, lavagem e secagem da primeira fase. Após a secagem, a lâmina foi coberta com uma gota de glicerina tamponada e montada com lamínula de vidro.

Para a leitura das reações, foi utilizado microscópio de fluorescência JENAMED 2. Em todas as lâminas havia os controles positivo e negativo. Os soros eram considerados positivos até a diluição na qual os taquizoítos apresentassem nítida fluorescência periférica.

Para efeito de análise considerou-se a linha de corte para os títulos de IgM acima ou igual a 128 e para IgG acima ou igual a 64.

3.5 Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total dos leucócitos foi realizada em analisador automático (System 9020A-X Hematology Analyzer – Serono Diagnostics). Os esfregaços de sangue foram corados pelo método de Rosenfeld e examinados em microscópio óptico, em objetiva de imersão (100X). A contagem diferencial foi realizada contando-se 100 células e obtendo-se o número relativo de cada elemento da linhagem branca e, a seguir, o número absoluto de cada um dos tipos celulares.

3.6 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi realizada no Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Alíquotas de 100 μ L de sangue total de cada felino foram utilizadas em triplicata, para a reação com anticorpos monoclonais conjugados com substância fluorescente. A estratégia de anticorpos empregada foi a que segue: ao primeiro tubo adicionou-se 1 μ L de anticorpo monoclonal anti-CD5 felino marcado com FITC (fluoresceína) (Southern Biotechnology Associates); ao segundo tubo adicionou-se 1 μ L de anticorpo monoclonal anti-CD8 felino marcado com FITC e 1 μ L de anticorpo monoclonal anti-CD4 felino marcado com PE (R-ficoeritrina) (Southern Biotechnology Associates); no último tubo não foi adicionado qualquer anticorpo, com a intenção de permitir a avaliação da possibilidade de fluorescência inespecífica (controle negativo). Em cada procedimento de leitura foram utilizadas duas amostras para, em um quarto tubo, adicionar-se 1 μ L de anticorpo monoclonal IgG1 de rato (controle isotópico) marcado com PE (Southern Biotechnology Associates). A solução foi mantida ao abrigo da luz durante 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 0,9mL de solução de lise de hemácias diluída na proporção de 1:10 com água destilada, conforme recomendações do fabricante (FACS Lysing Solution[®] 10X – BD Biosciences). O preparado final foi homogeneizado em vórtex durante 5 segundos, e submetido à leitura imediata em citômetro de fluxo (FacsCalibur[®] - BD Biosciences). Com base no tamanho e na granulosidade das células, foram contadas 10.000 células (Apêndice F). A área correspondente à população de células que expressaram fluorescência após a marcação anti-CD5 foi delimitada e chamada de “GATE”, que

correspondia à população de linfócitos. Apenas as células que pertenciam ao GATE foram consideradas para efeito de análise.

Os citogramas de análise forneceram a porcentagem relativa da população localizada no GATE. Com base nessa porcentagem, e utilizando o valor absoluto de linfócitos obtido ao hemograma, calculou-se o valor absoluto de cada subpopulação de linfócitos T.

3.7 Análise estatística

Para a análise estatística do número de oocistos eliminados no momento de soroconversão e no período de persistência das imunoglobulinas dos tipos M e G, utilizou-se a abordagem não paramétrica, por meio do teste de comparação de medianas Kruskal Wallis. Para a análise estatística da variável período de eliminação de oocistos, considerou-se a variável como qualitativa ordinal com 2 categorias (≤ 6 dias e ≥ 7 dias), e utilizou-se o teste exato de Fischer.

Para a comparação das curvas médias de cada grupo dos valores absolutos de leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos e das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ durante o experimento, utilizou-se a análise de regressão com medidas repetidas para estudo longitudinal (CHAND; CROWDER, 1995).

Para a tomada de decisão estatística, utilizou-se o valor de p (valor descritivo do teste).

Para o auxílio nos cálculos estatísticos utilizou-se o programa STATA.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A infecção dos animais dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) resultou na eliminação fecal - contínua ou intermitente - de oocistos durante 4 a 13 dias de duração, com período pré-patente de 4 a 6 dias (Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5) e na soroconversão (Tabelas 6 e 7) de todos os gatos inoculados.

Tabela 1 - Distribuição de felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) segundo o dia de eliminação de oocistos de *T. gondii*. São Paulo, 2002-2003

Grupo	Felino	Dia Pós Inoculação															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I	1	SF	-	-	SF	+	+	+	+	SF	+	SF	-	-	SF	-	-
	2	SF	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	SF	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	SF	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	7	-	-	-	+	SF	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
III	1	SF	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	SF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	3	SF	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	5	SF	-	-	+	+	+	+	+	+	SF	-	+	-	-	-	-
	6	SF	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	7	SF	-	SF	-	SF	+	+	-	+	-	SF	-	-	-	-	-

LEGENDA: SF: Sem Fezes

+: eliminação de oocistos

-: não eliminação de oocistos.

Tabela 2 - Número de felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) que apresentaram a eliminação de oocistos de *T. gondii* segundo o dia. São Paulo, 2002-2003

Grupo	Dia pós-inoculação															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I n=7	0	0	0	3	5	6	6	7	4	4	2	2	2	1	0	1
III n=7	0	0	0	2	4	6	6	6	7	3	2	3	1	1	0	1
Total	0	0	0	5	9	12	12	13	11	7	4	5	3	2	0	2

Tabela 3 - Número de oocistos eliminados pelos felinos do Grupo I (VIF+TOXO+) segundo o dia após a infecção por *T. gondii*. São Paulo, 2002-2003

Dpi	Grupo I						
	1	2	3	4	5	6	7
4	SF	<125.000	–	125.000	–	–	375.000
5	<125.000	<125.000	125.000	125.000	<125.000	SF	SF
6	250.000	–	<125.000	<125.000	500.000	125.000	125.000
7	<125.000	<125.000	<125.000	–	125.000	<125.000	<125.000
8	<125.000	<125.000	<125.000	<125.000	<125.000	<125.000	<125.000
9	SF	–	<125.000	–	<125.000	<125.000	<125.000
10	125.000	–	<125.000	–	<125.000	<125.000	–
11	SF	–	<125.000	–	–	<125.000	–
12	–	–	<125.000	–	–	<125.000	–
13	–	–	<125.000	–	–	<125.000	–
14	SF	–	<125.000	–	–	–	–
15	–	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	–	–	–	<125.000
Total	>375.000	<500.000	>125.000	>250.000	>625.000	>125.000	>500.000

LEGENDA: SF: Sem Fezes

–: Sem eliminação de oocistos

Tabela 4 - Número de oocistos eliminados pelos felinos do Grupo III (VIF-TOXO+) segundo o dia após a infecção por *T. gondii*. São Paulo, 2002-2003

Dpi	Grupo III						
	1	2	3	4	5	6	7
4	SF	<125.000	–	125.000	1.000.000	–	–
5	<125.000	SF	<125.000	125.000	1.250.000	–	SF
6	–	625.000	<125.000	<125.000	1.750.000	<125.000	125.000
7	1.250.000	<125.000	<125.000	–	3.750.000	<125.000	–
8	<125.000	500.000	<125.000	<125.000	125.000	<125.000	–
9	–	125.000	<125.000	–	125.000	<125.000	<125.000
10	–	125.000	<125.000	–	SF	<125.000	–
11	–	<125.000	<125.000	–	–	–	SF
12	–	<125.000-	<125.000	–	<125.000	–	–
13	–	<125.000-	–	–	–	–	–
14	–	<125.000	–	–	–	–	–
15	–	–	–	–	–	–	–
16	–	<125.000-	–	–	–	–	–
Total	>1.250.000	>1.375.000	<1.000.000	>250.000	>8.000.000	<1.000.000	>125.000

LEGENDA: SF: Sem Fezes

–: Sem eliminação de oocistos.

Nenhum animal dos Grupos II (VIF+TOXO-) e IV (VIF-TOXO-) eliminou oocistos.

Todos os felinos inoculados apresentaram conversão sorológica, com títulos detectáveis de anticorpos IgM entre o 7º e o 21º dpi e de anticorpos IgG entre 7º e o 14º dpi. O período de detecção de anticorpos IgM foi relativamente curto, e os títulos de anticorpos reduziram-se a níveis não detectáveis em todos os gatos infectados entre o 42º e o 49º dpi (IgM) e entre o 56º e o 63º dpi (IgG). Os títulos de anticorpos IgM e IgG, bem como o período em que os anticorpos foram detectados na circulação sanguínea estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 - Títulos de anticorpos (IgM) anti-*T. gondii* em felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+). São Paulo, 2002-2003

Grupo	Felino	Dias Pós-Inoculação														
		0	3	5	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
I	1	–	–	–	128	128	128	512	128	64	32	32	32	16	–	–
	2	–	–	–	128	256	128	256	128	–	–	–	–	–	–	–
	3	–	–	–	32	32	32	128	64	64	–	–	–	–	–	–
	4	–	–	–	–	256	64	64	16	–	–	–	–	–	–	–
	5	–	–	–	64	256	128	64	64	16	–	–	–	–	–	–
	6	–	–	–	256	256	512	512	256	16	–	–	–	–	–	–
	7	–	–	–	512	256	128	32	32	–	–	–	–	–	–	–
III	1	–	–	–	–	32	256	256	64	32	16	–	–	–	–	–
	2	16	–	–	512	256	128	256	128	64	–	–	–	–	–	–
	3	–	–	–	32	128	64	64	64	–	16	16	–	–	–	–
	4	–	–	–	–	–	128	128	128	16	16	–	–	–	–	–
	5	16	–	–	256	256	256	64	128	16	–	–	–	–	–	–
	6	–	–	–	–	64	128	256	256	–	–	–	–	–	–	–
	7	–	–	–	256	512	512	1024	256	256	64	32	–	–	–	–

LEGENDA: –: título menor que 16

Tabela 7 - Títulos de anticorpos (IgG) anti-*T.gondii* em felinos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+). São Paulo, 2002-2003

Grupo	Felino	Dias Pós-Inoculação														
		0	3	5	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
I	1	–	–	–	64	256	512	512	512	256	512	512	256	32	32	16
	2	–	–	–	128	128	256	512	1024	256	256	128	64	16	16	16
	3	–	–	–	32	32	128	512	512	128	256	128	64	32	32	16
	4	–	–	–	–	128	256	256	256	512	256	256	256	32	16	16
	5	–	–	–	32	128	128	256	256	256	256	128	128	32	16	16
	6	–	–	–	128	512	512	512	1024	512	256	512	256	32	16	16
	7	–	–	–	128	256	256	512	512	128	128	256	256	32–	16–	16
III	1	–	–	–	–	64	128	256	64	64	32	16	16	16	–	–
	2	16	–	–	128	128	128	256	256	128	256	256	128	32	16	16
	3	–	–	–	–	64	128	128	128	64	64	64	16	16	–	–
	4	16	–	–	–	–	64	128	128	256	64	128	32	16	16	16
	5	16	–	–	128	256	512	512	512	512	256	64	32	16	16	16
	6	–	–	–	–	64	128	256	128	128	256	256	16	16	16	16
	7	–	–	–	256	512	1024	2048	2048	1024	256	256	128	16	16	16

LEGENDA: -: título menor que 16

Nenhum animal dos Grupos II (VIF+TOXO-) e IV (VIF-TOXO-) soroconverteu ou apresentou títulos de anticorpos IgM ou IgG anti-*T. gondii*.

Os Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO-) não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao período de eliminação de oocistos ($p=1,00$), a quantidade de oocistos eliminados ($p=0,201$), a conversão por IgM ($p=0,535$) e por IgG ($p=0,789$) e a duração dos títulos de IgM ($p=0,674$) e de IgG ($p=0,123$).

Não houve óbito de nenhum animal dos Grupos experimentais.

Em relação aos sintomas, somente os animais dos Grupos I (VIF+TOXO+) e II (VIF+TOXO-) apresentaram linfadenomegalia, que já se manifestava em 2 e 3 animais, respectivamente, desde o início do experimento, sem alteração durante a realização deste.

Um gato (número 1) do Grupo I (VIF+TOXO+) apresentou quadro de uveíte anterior unilateral direita (Figura 1) autolimitante, com duração de quatro dias, entre o 10º e 13º dpi, sem necessidade de medicação. Nenhum animal apresentou alteração de fundo de olho, corio-retinite, por exemplo.

Figura 1 - Uveíte anterior unilateral direita (A) do gato número 1 do Grupo I (VIF+TOXO+) no 11º dpi. Observar *rubeosis iridis* tênue, flare + e precipitados ceráticos em pequena quantidade na câmara anterior ventralmente. B: olho esquerdo normal. São Paulo, 2002-2003

Apatia e episódios febris, contínuos e intermitentes, foram mais freqüentes no Grupo I (VIF+TOXO+), no qual 4 gatos apresentaram o sintoma entre o 2º e o 19º dpi. No Grupo III (VIF-TOXO+), apenas um gato apresentou o sintoma, entre o 2º e o 7º dpi.

Episódios de diarreia foram mais freqüentes e intensos no Grupo III (VIF-TOXO+). Todos os animais apresentaram diarreia pastosa, exceto um, que apresentou o quadro com fezes líquidas. O sintoma teve início no 2º dpi e foi até o 54º dpi. No Grupo I (VIF+TOXO+), todos os animais também apresentaram diarreia pastosa, mas em período menor, do 2º até o 29º dpi, e de forma menos intensa. No Grupo II (VIF+TOXO-) 4 animais, e no Grupo IV (VIF-TOXO-) 2 animais apresentaram diarreia pastosa intermitentemente durante todo o período experimental, porém, de forma menos intensa do que os outros Grupos experimentais.

Com relação ao número de leucócitos (Apêndice G), observou-se existência de diferença estatística entre os perfis médios entre os Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) ($p=0,047$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Perfil médio dos valores absolutos de leucócitos / mm^3 dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Quanto ao valor absoluto de neutrófilos segmentados (Apêndice H), não houve diferença entre os Grupos ($p>0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Perfil médio dos valores absolutos de neutrófilos segmentados / mm^3 dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Quanto ao valor absoluto de linfócitos (Apêndice I), houve diferença entre os Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) ($p=0,029$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Perfil médio dos valores absolutos de linfócitos / mm^3 dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Figura 2 - Citogramas ilustrando as fluorescências de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico do gato número 4 do Grupo III (VIF-TOXO+) (A) e do gato número 1 do Grupo I (VIF+TOXO+) (B) antes da inoculação com *T. gondii*. Os percentuais apresentados nos quadrantes indicam a porcentagem de cada subpopulação de linfócito T em cada animal. Os números nos quadrantes superiores à direita indicam o valor da relação CD4/CD8 de cada animal. A figura A ilustra o citograma de um felino não infectado com nenhum dos agentes com a relação CD4/CD8 na faixa de normalidade para a espécie. A figura B ilustra o citograma de um felino infectado com o VIF. Note-se que neste animal já ocorre inversão da relação CD4/CD8, resultante da infecção viral. São Paulo, 2002-2003

Quanto ao valor absoluto da subpopulação de linfócitos T CD4+ (Apêndice J), houve diferença entre os Grupos II (VIF+TOXO-) e IV (VIF-TOXO-) ($p=0,031$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Perfil médio dos valores absolutos da subpopulação de linfócitos T CD4+ dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Quanto ao valor absoluto da subpopulação de linfócitos T CD8+ (Apêndice L), houve diferença entre os Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) ($p=0,047$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Perfil médio dos valores absolutos da subpopulação de linfócitos T CD8+ dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Quanto à relação de linfócitos T CD4/CD8 (Apêndice M), os Grupos I (VIF+TOXO+) e II (VIF+TOXO-) diferiram estatisticamente dos Grupos III (VIF-TOXO+) e IV (VIF-TOXO-), respectivamente $p<0,001$ e $p=0,002$ (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Perfil médio da relação de linfócitos T CD4/CD8 dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A infecção toxoplásmica foi bem sucedida em todos os gatos dos Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+), que receberam cistos de *T. gondii*, o que foi comprovada pela eliminação fecal de oocistos e pela soroconversão. O bradizoíto livre ou contido em cistos é a forma do parasito de maior potencial infectante para os gatos, enquanto as formas em taquizoíto e esporozoíto contido nos oocistos são menos infecciosas para a espécie (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995b; DUBEY, 1996; DUBEY, 1998; DUBEY, 2001).

A ingestão de cistos teciduais (bradizoítos) é necessária inclusive para induzir a imunidade local intestinal, evitando a eliminação de oocistos em exposições posteriores, pois a inoculação parenteral de qualquer forma infectante - bradizoíto, taquizoíto ou esporozoíto - de *T. gondii* ou a inoculação oral de taquizoíto ou oocistos não conferem imunidade (DAVIS; DUBEY, 1995). A imunidade no trato intestinal é conferida tanto pela secreção de anticorpos da classe A (IgA) quanto G (IgG) (OMATA et al., 1997). Dubey (1995) induziu a reeliminação de oocistos em 4 gatos de um total de 9 desafiados pela segunda vez com cistos de *T. gondii* cepa P-89, 77 meses após o primeiro desafio com a cepa ME-49 (4 gatos) ou TS-2 (5 gatos). Tanto o período de eliminação - 2 a 4 dias - quanto a quantidade de oocistos eliminados nas fezes foram menores nessa indução do que no período de eliminação primária. A imunidade intestinal parece ser do tipo de premunição, porque a eliminação de oocistos pode ser deflagrada pela interferência na imunidade do felino na ausência de reinfecção. Doses imunodepressoras de corticóide (DUBEY; FRENKEL, 1974) e a infecção com *Isospora felis* (DUBEY; BEATTIE, 1988a) levaram a reeliminação de oocistos em gatos

previamente infectados. Lappin et al. (1991) não conseguiram induzir a reeliminação de oocistos em gatos recente e cronicamente infectados com *T. gondii* utilizando doses de 5 e 20 mg/Kg de acetato de metilprednisolona semanalmente, durante 4 semanas, por via IM.

Segundo Dubey (2001), apenas um bradizoíto é suficiente para infectar gatos, enquanto pelo menos 100 são necessários para infectar camundongos. Entretanto, em investigação anterior, Dubey (1996) infectou dois gatos, de um total de quatro, com 100 oocistos, e todos os gatos (4) que receberam 10.000 oocistos. A prática do carnivorismo, procedimento adotado para a infecção dos felinos dos Grupos I e III deste estudo, é a forma mais eficiente de gatos se infectarem na natureza com *T. gondii* após o desmame (DUBEY, 1998; DUBEY; BEATTIE, 1988a).

O período pré-patente dos gatos inoculados no presente experimento, independentemente de estarem co-infectados com o VIF, foi de 4 a 6 dias. O ciclo enteroepitelial resultante da ingestão de bradizoítos, como é o presente caso, é mais eficaz e mais precoce do que aquele decorrente da ingestão de taquizoítos ou oocistos esporulados (DAVIS; DUBEY, 1995; DUBEY, 2001; DUBEY, 1995). A eliminação fecal de oocistos ocorre 3 a 10 dias após a ingestão de bradizoítos (DAVIS; DUBEY, 1995; DUBEY, 2001; DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995a; LAPPIN et al., 1991), 18 dias após a ingestão de oocistos esporulados (DUBEY, 1996; FREYRE et al., 1989) e 19 ou mais dias, após a ingestão de taquizoítos (DUBEY, 2002). A eficiência máxima foi constatada com a infecção da totalidade dos gatos inoculados, enquanto Dubey (2002) relata eliminação fecal de oocistos em menos de 30% dos gatos que receberam taquizoítos ou oocistos esporulados.

O período de eliminação de oocistos registrado na literatura varia de menos de uma semana até duas a três semanas (DUBEY, 1995; DUBEY, 1996; DUBEY, 2001; DUBEY, 2002). Na presente investigação, o período de eliminação de oocistos foi similar ao que consta da literatura e não havendo diferenças entre os grupos, fato também observado por Lin, Bowman e Jacobson (1992b) e Lappin et al. (1996b).

A baixa intensidade de eliminação fecal de oocistos deste trabalho em relação ao que informam autores como Dubey (2001), Dubey (1995) e Dubey (1996), poderia ser atribuída à faixa etária dos gatos, à cepa utilizada e ao fato de se tratar de co-infecção, hipótese esta que deve ser desconsiderada pois os felinos de ambos os grupos apresentaram o mesmo perfil de baixa eliminação. Apenas em um animal do Grupo III (VIF-TOXO+) foi observada maior eliminação fecal em alguns momentos, destoando dos demais gatos do mesmo Grupo ou do Grupo I. Embora não tenha sido estatisticamente comprovada, a análise grosseira dos dados indica que houve aparentemente maior eliminação fecal nesse Grupo de animais. Lin, Bowman e Jacobson (1992b) que utilizaram gatos de 3 meses de idade, não observaram diferença entre os grupos co-infectado e infectado unicamente com *T. gondii*. Já Lappin et al. (1996b), que trabalharam com felinos adultos de 2 anos de idade infectados com o VIF, relatam ter ocorrido diferença entre os grupos apenas no 8º dpi.

A diferença na susceptibilidade à infecção pelo VIF e/ou *T. gondii* pode explicar os resultados contraditórios, não havendo consenso sobre a maior ou menor eliminação fecal de oocistos e sobre a quantidade e a duração da eliminação fecal. Portanto, não se pode afirmar que gatos infectados pelo VIF, nessa fase da infecção, apresentem maior potencial zoonótico que aqueles não infectados.

A faixa etária, mais do que a cepa utilizada, pode ter influência sobre a replicação enteroepitelial de *T. gondii*, resultando em maior eliminação fecal. Dubey (1995); Dubey (1996); Dubey (2001) e Dubey (2002) encontraram alta intensidade de eliminação diária de oocistos, entre 3 a 360 milhões, em felinos jovens, de menos de um ano de idade, infectados com diferentes cepas (VEG, ME49 e TS-2).

Assim, embora existam cepas mais oocistogênicas, a cepa P utilizada nos gatos do experimento ora relatado não parece ter essa característica, como a cepa P-89 utilizada por Dubey (1995), pois na fase de obtenção de oocistos para o preparo do inóculo em camundongos, foram utilizados dois gatos jovens (de 3 e 4 meses de idade), que também apresentaram baixa eliminação fecal.

D'Amore et al. (1997), Dorny et al. (2002), Lappin et al. (1993), Lucas et al. (1998) e Witt et al. (1989), encontraram maior soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos co-infectados com o VIF. Para Lappin et al. (1992a), essa poderia ser uma decorrência dos efeitos imunodepressores da infecção pelo retrovírus, que promoveria uma transitória proliferação de bradizoítos nos cistos aumentando a produção de antígeno que, por sua vez, estimularia os linfócitos B a produzir anticorpos específicos. Outra possibilidade estaria relacionada ao fato de gatos infectados pelo VIF produzirem anticorpos anti-*T. gondii* como parte da ativação policlonal generalizada não específica de linfócitos B. E, por último, a infecção direta de linfócitos B pelo VIF poderia levar essas células a produzir anticorpos específicos contra antígenos não relacionados ao vírus. Tais hipóteses foram novamente aventadas por Lappin et al. (1993), que constataram que gatos naturalmente co-infectados por esses agentes têm maior probabilidade de apresentar títulos persistentes de IgM e menores títulos de IgG anti-*T. gondii*. A função normal de linfócitos T auxiliares é necessária para a indução e

manutenção dos títulos de anticorpos, e também para a troca de classes de imunoglobulinas. A infecção pelo VIF em gatos pode suprimir essa função, levando ao retardo na produção e na troca de classes de imunoglobulinas (TORTEN et al., 1991).

Diante dessas considerações, seria possível supor, que em gatos com o VIF e co-infectados com *T. gondii*, a produção de anticorpos IgM e a troca de classe M para G seriam alteradas. No presente experimento essa hipótese não pôde ser confirmada pois todos os gatos do Grupo I, exceto um, apresentaram soroconversão em 7 a 14 dias, enquanto no Grupo III, 5 dos 7 gatos soroconverteram nesse período. Portanto, assim como a comparação do período de soroconversão, a comparação do período de duração de anticorpos IgM anti-*T. gondii* não revelou diferenças estatísticas entre os grupos. Tais achados são diferentes dos resultados obtidos por Lin, Bowman e Jacobson (1992b) que encontraram uma semana de retardo na conversão sorológica (IgM) entre o grupo de gatos co-infectados comparados ao grupo de gatos que só havia sido infectado com *T. gondii*, sugerindo assim que a infecção pelo VIF interfere de alguma forma na soroconversão desses animais. Lappin et al. (1996b) observaram títulos de IgM mais baixos e retardo na conversão da classe de imunoglobulina M para G em gatos co-infectados, em relação àqueles infectados apenas com *T. gondii*.

A maioria dos gatos de ambos os grupos manteve títulos de anticorpos IgM até a 35^o dpi ou até a 5^a spi. Títulos máximos foram observados entre a 2^a e a 4^a spi, o que difere dos achados de Omata et al. (1990) que, com o auxílio da técnica de RIFI, encontraram anticorpos IgM anti-*T. gondii* na circulação sanguínea por apenas 1 a 2 semanas. Já Lappin et al. (1996b), que utilizaram o ensaio ELISA, encontraram títulos de IgM entre 1 e 16 semanas. A precocidade do aparecimento de anticorpos IgM na

circulação sanguínea, com títulos máximos já na 2ª spi, também foi observado por Lin, Bowman e Jacobson (1992b).

A IgM possui vida média curta e geralmente desaparece pelo 42º dpi (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995b), o que foi observado no presente experimento. A detecção de IgM em gatos infectados com o VIF nem sempre indica infecção recente. LAPPIN et al. (1993) observaram títulos de IgM persistentes durante meses após a infecção primária com *T. gondii*. A persistência de anticorpos IgM na circulação sanguínea por prolongado período de tempo, o que não ocorre usualmente, pode ser creditada ao efeito da prévia infecção pelo VIF, que teria alterado a resposta imune naqueles gatos. O desaparecimento dos títulos de IgM e a curta duração da presença de IgG nos gatos inoculados no presente experimento pode ser creditada à fase assintomática da infecção pelo VIF, durante a qual também, a resposta humoral dos gatos co-infectados está mantida. Adicionalmente, pode estar relacionado à baixa virulência da cepa de *T. gondii* utilizada.

A variação dos títulos de anticorpos pode decorrer de fatores ligados ao hospedeiro, aos agentes e às cepas envolvidas, e também de peculiaridades da técnica utilizada para essa detecção. Dubey, Lappin e Thulliez (1995b) encontraram títulos de anticorpos mais baixos ao utilizar a cepa P-89 do que quando utilizaram as cepas ME-49 ou TS-2.

Gatos desenvolvem títulos de IgG dentro de 1 a 3 semanas após a infecção primária (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995b; OMATA et al., 1990). No presente experimento, todos os animais, à exceção de dois, um em cada grupo, apresentaram soroconversão, com títulos de IgG na 2ª spi. Os picos dos títulos foram atingidos entre a 4ª e a 6ª spi para ambos os grupos e, de forma inesperada, declinaram abruptamente

na 10^a spi, sendo que os animais do Grupo I mantiveram títulos por uma semana a mais que a maioria dos gatos do Grupo III, que demonstraram quedas gradativas de seus títulos, e não de forma tão abrupta quanto os gatos do Grupo I. Os gatos do Grupo I apresentaram mais episódios de febre sustentada e apatia - inclusive um deles apresentou quadro de uveíte anterior unilateral -, e menor período de diarreia do que os gatos do Grupo III. Essa divergência de sintomas permite que se avente a hipótese de que os animais do Grupo I tenham permanecido em parasitemia, efetuando o ciclo extra-intestinal do parasita, durante maior período de tempo do que os gatos do Grupo III, cuja fase enteroepitelial ocorreu de forma mais exuberante. Lin e Bowman (1991) detectaram títulos apenas a partir da 2^a spi, e elevação desses títulos até a 6^a spi, quando o experimento foi finalizado. Lin, Bowman e Jacobson (1992b) encontraram títulos de IgG em ambos os grupos de gatos até a 14^o spi, quando o experimento terminou, e observaram que gatos co-infectados com o VIF tinham uma semana de retardo na ascensão de seus títulos de IgM e IgG. Já Lappin et al. (1996b) detectaram títulos de IgG anti-*T. gondii* do 15^o dpi ao 154^o dpi, e também, após e durante o desafio, 66 semanas após a primo-infecção. Também Dubey (1995) com o auxílio do teste TAM (com antígeno fixado em formalina) e pelo ELISA, constataram altos títulos de IgG até 60 meses após a primo-infecção, e Dubey e Thulliez (1989) observaram altos títulos de IgG até 29 meses depois da primo-infecção, mas verificaram queda abrupta desses títulos dois meses após a primo-infecção quando o teste utilizado para a detecção de anticorpos foi o TAM com antígeno fixado em acetona.

Na presente investigação, 4 gatos (animais 1, 2, 6 e 7) do Grupo I (VIF+TOXO+) e 3 gatos (animais 2, 5 e 7) do Grupo III (VIF-TOXO+) apresentaram títulos de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* durante a fase de eliminação de oocistos. Utilizando

as técnicas ELISA e TC, Dubey (1995) não encontrou anticorpos antes do 14^o dpi, no período em que seus animais eliminaram oocistos. Quando o autor utilizou a técnica do TAM, apenas 5 gatos de 15 tinham anticorpos detectados no 10^o dpi. Segundo os trabalhos de Dubey (1997), Dubey e Frenkel (1976) e Freyre et al. (1989), mais de 50% dos gatos que estejam eliminando oocistos serão soronegativos.

É interessante notar que a presença de anticorpos IgM naturais e específicos anti-*T. gondii* séricos não devem influenciar o término da eliminação de oocistos pois, como provaram Kaneko et al. (2004) a IgM felina natural, ao contrário de sua contrapartida em suínos, caninos e coelhos, não é capaz de ativar o complemento, pela via clássica, e destruir taquizoítos *in vitro*. Os autores concluem que o *T. gondii* possui um mecanismo de evasão ao complemento específico do soro felino. Omata et al. (1997) demonstraram que as imunoglobulinas das classes G e A têm efeito protetor sobre o trato intestinal de gatos contra a infecção pelo *T. gondii*. Dessa forma, a elevação dos títulos de IgG, que atingiram seu pico entre a 4^a e a 6^a spi, em ambos os Grupos, e a possível síntese de IgA, que ocorre entre a 3^a e a 4^a spi no soro (LAPPIN et al., 1996b), podem ter influenciado no término da eliminação de oocistos pelos gatos investigados neste trabalho.

Lin, Bowman e Jacobson (1992b) encontraram baixos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos infectados pelo VIF antes de receberem o inóculo de *T. gondii*. Há evidências de ativação não específica de linfócitos B, que produzem anticorpos a outros patógenos, em pessoas infectadas pelo VIH-1 (MARMOR et al., 1984). Assim, deve-se ter cautela na interpretação de baixos títulos de anticorpos em pessoas e gatos infectados respectivamente pelo VIH-1 e pelo VIF.

Em ambos os grupos, a cepa de *T. gondii* utilizada mostrou-se patogênica com baixa virulência. Os integrantes do Grupo I (VIF+TOXO+) apresentaram picos febris e apatia mais frequentes e contínuos, além de diarreia mais branda, do que os gatos do Grupo III (VIF-TOXO+), que apresentaram quadro entérico mais exuberante. A apresentação clínica da toxoplasmose em gatos depende de vários fatores, relacionados tanto ao hospedeiro (idade em que ocorre a infecção, estado imunitário, doenças concomitantes) quanto ao parasito (cepa, forma infectante, dose do inóculo, vias de inoculação).

Os cistos teciduais se formam na maioria dos tecidos no organismo, persistem por toda a vida do animal, são fonte contínua de liberação de antígenos e podem ser reativados sob determinadas circunstâncias, quando em situações de imunodepressão (DUBEY; BEATTIE, 1988b). Os sintomas clínicos da toxoplasmose têm sido atribuídos à ruptura celular decorrente da replicação do agente, à necrose associada à reações de hipersensibilidade tardia e à vasculite pela deposição de imunecomplexos (LAPPIN et al., 1989).

Dubey e Carpenter (1993) realizaram um estudo retrospectivo de 100 casos de toxoplasmose felina fatal confirmados ao exame histopatológico, que compreendeu o período de 1952 a 1990. As alterações clínicas apresentadas eram diversas, mas infecções foram constatadas em 97,7% dos pulmões analisados, em 93,3% do tecido hepático, em 96,4% do tecido nervoso central, em 84,4% do tecido pancreático e em 81,5% dos olhos analisados. Portanto, dos 100 casos analisados, 36 foram considerados quadros generalizados, 26 com lesões predominantemente pulmonares, 16 envolvendo os órgãos abdominais, 2 envolvendo apenas o fígado, 7 envolvendo o SNC, e 9 casos de toxoplasmose neonatal. Quadros oculares foram constatados em 22

dos 27 gatos em que havia material ocular para ser analisado, e todos estavam associados a quadros generalizados ou sistêmicos. A lesão mais freqüente foi iridociclocoroidite multifocal em 18 casos (81,8%). Neste experimento, um gato do Grupo I (VIF+TOXO+) apresentou quadro de uveíte anterior unilateral com remissão espontânea. Apenas desse gato, durante procedimento anestésico, colheu-se humor aquoso da câmara anterior de ambos os olhos, que foi encaminhado para a realização de PCR, além de sangue total também. Amplificou-se material genético específico de *T. gondii* a partir do sangue total e do olho afetado do animal.

Em casos suspeitos de uveíte determinada pelo *T. gondii*, a PCR do humor aquoso, associada aos dados do histórico, aos sintomas e aos exames sorológicos, pode auxiliar no diagnóstico da afecção. Entretanto, é necessário ressaltar que a amplificação de material genético específico de *T. gondii* no humor aquoso, como também em outros tecidos e fluídos, pode ocorrer mesmo sem evidência de inflamação e nem sempre está correlacionada à doença (BURNEY et al., 1998; LAPPIN et al., 1996a; LIN; BOWMAN; JACOBSON, 1992a; STILES et al., 1996). Na mesma linha de raciocínio, Burney et al. (1999) demonstraram que a PCR em sangue total não é útil para o diagnóstico de toxoplasmose-doença, pois os gatos inoculados experimentalmente mostraram-se em parasitemia durante muito tempo, em vários momentos, sem qualquer sintoma de comprometimento orgânico.

Além do *T. gondii*, outros agentes infecciosos, como o VIF, o vírus da Leucemia Felina e o coronavírus felino podem desencadear uveíte em felinos (DUBEY; LAPPIN, 1998). No presente estudo, após a inoculação experimental com o VIF, durante a fase aguda da infecção, dois gatos haviam apresentado uveíte anterior, um com resolução espontânea e outro em que necessitou de medicação (ZANUTTO et al., [2005]) (em

fase de elaboração)¹. Portanto, mesmo diante das evidências sorológicas e de biologia molecular no gato co-infectado mencionado anteriormente, é temerário afirmar que o *T. gondii* foi o agente causal único. Lappin et al. (1989) descrevem 3 casos de uveíte anterior e retinocoroidite em gatos co-infectados naturalmente, dois dos quais apresentaram boa evolução após o tratamento anti-*Toxoplasma*. Talvez a associação dos dois agentes tenha produzido um quadro mais agressivo ocular e sistêmico, conforme observado por Davidson et al. (1993), que inocularam por via intra-carotídea 10.000 taquizoítos, cepa ME-49, em oito gatos co-infectados com o VIF e 8 gatos sem a infecção. Os gatos do grupo não co-infectado desenvolveram corio-retinite multifocal com poucos sintomas sistêmicos e resolução em 3 semanas, enquanto os gatos co-infectados apresentaram quadros sistêmico e ocular (corio-retinite com formação de granulomas subretinianos, descolamento localizado de retina e uveíte anterior) mais severos. Adicionalmente, 6 gatos desse mesmo grupo foram a óbito, a despeito do tratamento com clindamicina ao qual três deles haviam sido submetidos.

Existe uma clara associação entre uveíte anterior e posterior em gatos com toxoplasmose generalizada (DAVIDSON et al., 1993), mas a influência do *T. gondii* no desencadeamento de uveíte anterior em gatos infectados porém com bom prognóstico é mais difícil de explicar. Alguns pesquisadores sugerem ser a toxoplasmose a principal causa da uveíte anterior aguda e crônica em gatos, e na maioria dos casos não ocorre grave envolvimento sistêmico da infecção (BURNEY et al., 1998; HILL et al., 1995; LAPPIN et al., 1989; LAPPIN et al., 1992b; LAPPIN et al., 1992c; LAPPIN, 1996; LAPPIN et al., 1996a; STILES et al., 1996).

¹ ZANUTTO, M. S.; HAGIWARA, M. K.; FROES, T.; TEIXEIRA, A. L. Caracterização clínica da fase aguda da infecção de felinos pelo Vírus da Imunodeficiência Felina. A ser editado pela Ciência Rural, [2005]

O VIF infecta linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B e macrófagos (DEAN et al., 1996; DOW; MATHIASON; HOOVER, 1999; PEDERSEN et al., 2001; RITCHEY et al., 2001), o que resulta na perda lenta e progressiva de linfócitos T CD4⁺ e inversão da relação CD4/CD8 (REUBEL et al., 1994; TORTEN et al., 1991).

Durante o período estudado, não houve diferença entre os grupos com relação aos valores absolutos de neutrófilos. Lappin et al. (1996b) relatam linfopenia e neutropenia mais intensos após a inoculação de *T. gondii* em gatos infectados com o VIF, enquanto que Lappin et al. (1992a) não observaram qualquer alteração hematológica. Já Kubes et al. (2003) encontraram reduzido rolamento, adesão e emigração da vasculatura *in vivo* de neutrófilos, além de quimiotaxia reduzida a IL-8, em gatos infectados pelo VIF com 12 semanas de evolução.

Os gatos dos Grupos II (VIF+TOXO-) e IV (VIF-TOXO-) diferiram estatisticamente com relação aos valores absolutos de linfócitos T CD4⁺, enquanto a análise grosseira dos dados dos outros grupos mostra também que esse grupo, apenas infectado com o VIF, tendia a ter valores mais baixos de linfócitos T CD4⁺ do que os outros. Adicionalmente, apenas os animais infectados com o VIF possuíam relação CD4/CD8 mais baixa do que os integrantes dos grupos não infectados por esse vírus. Esse fato está relacionado à infecção e destruição progressiva desse tipo celular pelo vírus (DEAN et al., 1996; REUBEL et al., 1994; TORTEN et al., 1991). Lappin et al. (1992a) também encontraram alterações na quantidade de linfócitos T CD4⁺ apenas no grupo infectado com o VIF em níveis mais baixos do que nos grupos não infectados. REUBEL et al. (1994) verificaram que os gatos infectados com o VIF e não desafiados com nenhum outro patógeno desenvolviam valores mais baixos de linfócitos T CD4⁺ e menor relação CD4/CD8 do que aqueles gatos, também infectados com o retrovírus,

mas desafiados, em momentos diferentes, com patógenos comuns (Herpesvírus felino tipo 1, Calicivírus felino e *Haemobartonella felis*). Provavelmente, o menor desafio antigênico enfrentado por esses animais, e também no Grupo II no presente experimento, determinou essa dinâmica celular.

Os Grupos I (VIF+TOXO+) e III (VIF-TOXO+) diferiram com relação aos valores de leucócitos e absolutos de linfócitos (T CD8+), tendo o grupo co-infectado valores mais altos destas células. Lappin et al. (1996b) não encontraram alterações nestas subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) em sangue periférico em nenhum dos grupos experimentais, nem após a exposição secundária ao *T. gondii*.

O grupo de gatos co-infectados deste trabalho apresentou números maiores de linfócitos T CD8+ durante todo o experimento. A característica que distinguiu gatos infectados com o VIF de gatos não infectados que receberam a inoculação posterior de *T. gondii* foi a indução de linfócitos T CD8+, provavelmente capazes de produzir altos níveis de IL-10 e IFN- γ , e incapazes de sintetizar IL-12 (DEAN et al., 1998; KIPAR et al., 2004; KOYAMA et al., 1999; SHIMOJIMA et al., 2003). A identificação de linfócitos T CD8+ em gatos infectados pelo VIF (FLYNN et al., 2002; LEVY et al., 1998; LEVY et al., 2004) e em humanos portadores do VIH (GRAZioni et al., 1994), permitiu que esse tipo celular fosse considerado o responsável pela alterada secreção de citocinas desequilibrando o sistema.

Esse perfil de citocinas em gatos co-infectados poderia estar associado à maior replicação de taquizoítos e o desenvolvimento de doença mais severa, conforme mencionam alguns autores (DAVIDSON et al., 1993; DAVIDSON; ENGLISH, 1998; LACROIX et al., 1996; LIN; BOWMAN; JACOBSON, 1992b). No experimento ora

apresentado, o perfil de citocinas poderia explicar a maior frequência de episódios febris e o desenvolvimento de um caso de uveíte no grupo de gatos co-infectados, decorrente de um período provavelmente maior de parasitemia, e do consequente aumento de disseminação e replicação teciduais do agente, inclusive em tecido ocular.

É bem documentado que indivíduos infectados pelo VIH e gatos infectados pelo VIF têm tendência à linfocitose de linfócitos T CD8⁺ nas fases aguda e crônica da infecção, com fenótipo predominante de ativação (CD8 β CD62L^{negativo} Integrina^{alto}). Esses linfócitos T CD8⁺ ativados foram capazes de inibir a replicação do vírus em linfócitos T CD4⁺, sugerindo que tais células possuem característica supressora (CRAWFORD et al., 2001; GEBHARD et al., 1999). Ainda há controvérsias quanto à capacidade dos linfócitos T CD8⁺, que suprimem a replicação viral, em suprimir também outras funções imunes, mas tal hipótese parece ser viável: o perfil de citocinas sintetizadas e o fenótipo dessas células, têm as mesmas características dos linfócitos supressores, que produzem também altos níveis de IL-10 e IFN- γ , mas não IL-2 (INOUE et al., 1993). A elevada síntese de IL-10, que possui forte efeito inibitório sobre a ativação de macrófagos como também sobre a síntese de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-12 e IL-13 (JOSS et al., 2000), favoreceria a disseminação de *T. gondii* e a gravidade do quadro clínico da doença.

Trabalhando com camundongos transgênicos, Tesselaar et al. (2003) demonstraram que a constante estimulação de linfócitos B e linfócitos T, via CD70-CD27, levaria à depleção da população de linfócitos T “naive” e predisporia os animais a infecções oportunistas banais. É interessante notar que esse mecanismo, inicialmente mostra intensa ativação celular (esplenomegalia, linfadenomegalia) promove, com o

passar do tempo, depleção da população de linfócitos “naive” (involução linfóide). A evolução clínica dos camundongos cursava como a de indivíduos infectados com o VIH e gatos infectados com o VIF, o que também foi observado na primeira fase desta investigação, na qual se procedeu à inoculação do VIF clade B (ZANUTTO et al., [2005]) (em fase de elaboração)². Uma fase inicial de intensa ativação celular em decorrência da maior carga viral, seguida por um período assintomático extenso, caracterizado pelo controle da replicação viral que, embora ainda estivesse presente, mas muitas vezes em níveis indetectáveis. Quando a reserva de linfócitos “naive” fosse exaurida pela constante estimulação antigênica, não só por esse retrovírus, mas também por outros agentes infecciosos concomitantes, o controle imunitário frente a quadros infecciosos e neoplasias estaria perdido, caracterizando a fase de Imunodeficiência Adquirida, com mau prognóstico. O trabalho de Tesselaar et al. (2003) é interessante porque demonstra a influência dos linfócitos B, relacionando-se a outros tipos celulares, na gênese do quadro de imunodeficiência. Afinal, durante alguns anos deu-se muita atenção às alterações relacionadas ao linfócito T CD4+.

Assim, a ampla ativação e expansão de linfócitos T CD8+ supressores, já na fase aguda da infecção pelo VIF, poderia contribuir diretamente para uma resposta imune deficiente a patógenos secundários em gatos infectados pelo VIF, como ocorre durante a infecção pelo *T. gondii*.

² ZANUTTO, M. S.; HAGIWARA, M. K.; FROES, T.; TEIXEIRA, A. L. Caracterização clínica da fase aguda da infecção de felinos pelo Vírus da Imunodeficiência Felina. A ser editado pela Ciência Rural, [2005]

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente experimento permitiram as seguintes conclusões:

1. A infecção pelo VIF clade B não interferiu na evolução da infecção toxoplásmica (cepa P) no que se refere ao período e à quantidade de oocistos eliminados, e à soroconversão e à duração das imunoglobulinas IgM e IgG na circulação sanguínea. Portanto, na fase assintomática da infecção, os gatos infectados por este vírus não se constituem em maior risco para a saúde pública.
2. O quadro clínico determinado pela infecção toxoplásmica pela cepa P mostrou-se mais intensa nos gatos infectados pelo VIF clade B.
3. A evolução da infecção pelo VIF determina perda progressiva de linfócitos T CD4+ e aumento da subpopulação de linfócitos T CD8+, o que eventualmente pode favorecer o oportunismo de outros agentes infecciosos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- BARIL, L.; ANCELLE, T.; GOULET, V.; THULLIEZ, P.; TIRARD-FLEURY, V.; CARME, B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 31, p. 305-309, 1999.
- BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERKER, D. H. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **Lancet**, v. 350, p. 173-177, 1997.
- BURKHARD, M. J.; MATHIASON, C. K.; O'HALLORAN, K. Kinetics of early FIV infection in cats exposed via the vaginal versus intravenous route. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 18, p. 217-226, 2002.
- BURNEY, D. P.; CHAVKIN, M. J.; DOW, S. W.; POTTER, T. A.; LAPPIN, M. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* within aqueous humor of experimentally-inoculated cats. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 181-186, 1998.
- BURNEY, D. P.; LAPPIN, M. R.; SPILKER, M.; McREYNOLDS, L. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia in experimentally inoculated cats. **The Journal of Parasitology**, v.85, n. 5, p. 947-951, 1999.
- CHOI, W. Y.; NAM, H. W.; KWAK, N. H. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p. 1280-1282, 1997.
- CHOUGNET, C.; WYNN, T. A.; CLERICI, M.; LANDAY, A. L.; KESSLER, H. A.; RUSNAK, J.; MELCHER, G. P.; SHER, A.; SHEARER, G. M. Molecular analysis of decreased interleukin-12 production in persons infected with human immunodeficiency virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p. 46-53, 1996.
- COOK, A. J.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. **British Medical Journal**, v. 321, p. 142-147, 2000.
- CRAWFORD, P. C.; PAPADI, G. P.; LEVY, J. K.; BENSON, N. A.; MERGIA, A.; JOHNSON, M. A. Tissue dynamics of CD8 lymphocytes that suppress viral replication in cats infected neonatally with feline immunodeficiency virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 671-681, 2001.
- CROWE, S. M.; CARLIN, J. B.; STEWART, K. I.; LUCAS, R.; HOY, J. F. Predictive Value of CD4+ Lymphocyte Numbers for the Development of Opportunistic Infections and Malignancies in HIV-Infected Persons. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.4, n. 8, p.770-776, 1991.

- D'AMORE, E.; FALCONE, E.; BUSANI, L.; TOLLIS, M. A serological survey of feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* in stray cats. **Veterinary Research Communications**, v. 21, p. 355-359, 1997.
- DAVIDSON, M.G.; ENGLISH, R. V. Feline ocular toxoplasmosis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 1, n. 5, p. 71-80, 1998.
- DAVIDSON, M. G.; ROTTMAN, J. B.; ENGLISH, R. V.; LAPPIN, M. R.; TOMPKINS, M. B. Feline Immunodeficiency Virus Predisposes Cats to Acute Generalized Toxoplasmosis. **American Journal of Pathology**, v. 143, n. 5, p. 1486-1497, 1993.
- DAVIS, S. W.; DUBEY, J. P. Mediation of Immunity to *Toxoplasma gondii* Oocyst Shedding in Cats. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 882-886, 1995.
- DE BOER, J. H.; VERHAGEN, C.; BRUINENBERG, M. Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 121, p. 650-658, 1996.
- DEAN, G. A.; PEDERSEN, N. C. Cytokine response in multiple lymphoid tissues during the primary phase of feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Virology**, v. 72, n. 12, p. 9436-9440, 1998.
- DEAN, G. A.; REUBEL, G. H.; MOORE, P. F. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymphnode. **Journal of Virology**, v. 70, p. 5165-5169, 1996.
- DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 562-568, 1980.
- DORNY, P.; SPEYBROECK, N.; VERSTRAETE, S.; BAEKE, M.; DE BECKER, A.; BERKVEN, D.; VERCRUYSSSE, J. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. **The Veterinary Record**, v. 23, p. 626-629, 2002.
- DOW, S. W.; MATHIASON, C. K.; HOOVER, E. A. In vivo monocyte tropism of pathogenic feline immunodeficiency viruses. **Journal of Virology**, v. 73, p. 6852-6861, 1999.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.
- DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* by cats. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 410-415, 1995.
- DUBEY, J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 6, p. 957-961, 1996.

- DUBEY, J. P. Oocyst Shedding by Cats Fed Isolated Bradyzoites and Comparison of Infectivity of Bradyzoites of the VEG Strain *Toxoplasma gondii* to Cats and Mice. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 215-219, 2001.
- DUBEY, J. P. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. **Nature**, v. 262, p. 213-214, 1976.
- DUBEY, J. P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 713-717, 2002.
- DUBEY, J. P. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v. 115, p. 15-20, 1997.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57-72, 2004.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. General Biology. In: _____ (Ed.). **Toxoplasmosis of Animals and Man**, Boca Raton: CRC Press, 1988a, p. 1-40.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis in man (*Homo sapiens*). In: _____ (Ed.). **Toxoplasmosis of animals and man**, Boca Raton: CRC Press, 1988b, p. 41-60.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L. Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats: 100 cases (1952-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 11, p. 1556-1566, 1993.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **The Journal of Protozoology**, v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 350-379, 1974.
- DUBEY, J. P.; HOOVER, E. A.; WALLS, K. W. Effect of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. **The Journal of Protozoology**, v. 24, n. 1, p. 184-186, 1977.
- DUBEY, J. P.; LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious Diseases of the dog and cat**, Philadelphia: WB Saunders, 1998, p. 493-509.
- DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 9, p. 1297-1299, 1989.
- DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 2, p. 179-185, 1995a.

- DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 887-893, 1995b.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.
- FLYNN, J. N.; DUNHAM, S.; MUELLER, A.; CANNON, C.; JARRET, O. Involvement of cytolytic and non-cytolytic T cells in the control of feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, p. 159-170, 2002.
- FREYRE, A.; DUBEY, J. P.; SMITH, D. D.; FRENKEL, J. K. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 750-755, 1989.
- FUENTES, I.; RUBIO, J. M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1566-1570, 2001.
- GAZZINELLI, R.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactive chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 1, p. 175-180, 1992.
- GEBHARD, D. H.; DOW, J. L.; CHILDERS, T. A.; ALVELO, J. I.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. F. Progressive expansion of an L-selectin-negative CD8 cell with anti-feline immunodeficiency virus (FIV) supressor function in the circulation of FIV-infected cats. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1503-1513, 1999.
- GRAZIONI, C.; PANTALEO, G.; GANTT, K. R.; FORTIN, J.; DEMAREST, J. F.; COHEN, O. J.; SÉKALY, R. P.; FAUCI, A. S. Lack of evidence for the dichotomy of Th1 and Th2 predominance in HIV-infected individuals. **Science**, v. 265, p. 248-252, 1994.
- GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 633-639, 2001.
- HAND, D.; CROWDER, M. Introduction. In: CHATFIELD, C.; ZIDEK, J. V. (Ed.). **Practical Longitudinal Data Analysis**, London: Chapman & Hall, 1995, p. 1-12.
- HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 634-640, 2002.
- HILL, S.L.; LAPPIN, M.R.; CARMAN, J.; COLLINS, J.K.; REIF, J.S.; SPILKER, M.; JENSEN, C. Comparison of methods for estimation of *Toxoplasma gondii*-specific

antibody production in the aqueous humor of cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1181-1187, 1995.

HOWE, D.K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HUNTER, C. A.; ABRAMS, J. S.; BEAMAN, M. H.; REMINGTON, J. S. Cytokine mRNA in the Central Nervous System of SCID Mice Infected with *Toxoplasma gondii*: Importance of T-Cell-Independent Regulation of Resistance to *T. gondii*. **Infection and Immunity**, v.61, n. 10, p.4038-4044, 1993.

INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 131-138, 1997.

INOUE, T.; ASANO, Y.; MATSUOKA, S.; FURUTANNI-SEIKI, M.; AIZAWA, S.; NISHIMURA, H.; SHIRAI, T.; TADA, T. Distinction of mouse CD8+ supressor effector T cell clones from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms. **The Journal of Immunology**, v.150, n. 6, p. 2121-2128, 1993.

ISHIDA, T.; TOMODA, I. Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 52, p. 645-648, 1990.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M.; MCQUILLAN, G.; NAVIN, T.; MCAULEY, J. B. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 357-365, 2001a.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 56, n. 5, p. 296-305, 2001b.

JOSS, A.; AKDIS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD-28 co-stimulation pathway. **European Journal of Immunology**, v.30, p. 1683-1690, 2000.

KANEKO, Y.; TAKASHIMA, Y.; XUAUN, X.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; OTSUKA, H. Natural IgM antibodies in sera from various animals but not the cat kill *Toxoplasma gondii* by activating the classical complement pathway. **Parasitology**, v. 128, p. 123-129, 2004.

- KAPPERUD, G.; JENUM, P. A.; STRAY-PEDERSEN, B. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway. **American Journal of Epidemiology**, v.144, p. 405-412, 1996.
- KHAN, I. A.; MATSURA, T.; KASPER, L. H. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1639-1642, 1994.
- KIPAR, A.; BORETTI, F. S.; MELI, M. M.; FAILING, K.; REINACHER, M.; LUTZ, H. Reduced constitutive cytokine transcription in isolated monocytes of clinically healthy cats, infected with an FIV strain of low pathogenicity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, p. 215-221, 2004.
- KOYAMA, T.; OMATA, Y.; MAKI, Y.; TOYODA, Y.; SAITO, A. Interleukin-12, Interferon- γ and Interleukin-4 Gene Expression in Cats Infected with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 7, p. 819-821, 1999.
- KUBES, P.; HEIT, B.; MARLE, G.; JOHNSTON, J. B.; KNIGHT, D.; KHAN, A.; POWER, C. In vivo impairment of neutrophil recruitment during lentivirus infection. **Journal of Immunology**, v.171, p. 4801-4808, 2003.
- LACROIX, C.; BRUN-PASCAUD, M.; MASLO, C.; CHAU, F.; ROMAND, S.; DEROUIN, F. Co-infection of *Toxoplasma gondii* with Other Pathogens: Pathogenicity and Chemotherapy in Animal Models. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 219, p. 223-233, 1996.
- LAPPIN, M. R. Feline toxoplasmosis: interpretation of diagnosis test results. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 154-160, 1996.
- LAPPIN, M. R.; BURNEY, D. P.; DOW, S. W.; POTTER, T. A. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor of cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 11, p. 1589-1593, 1996a.
- LAPPIN, M. R.; DAWE, D. L.; LINDL, P. A.; GREENE, C. E.; PRESTWOOD, A. K. The Effect of Glucocorticoid Administration on Oocyst Shedding, Serology, and Cell-Mediated Immune Responses of Cats with Recent or Chronic Toxoplasmosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 625-632, 1991.
- LAPPIN, M. R.; GASPER, P. W.; ROSE, B. J.; POWELL, C. C. Effect of primary phase feline immunodeficiency virus infection on cats with chronic toxoplasmosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 121-131, 1992a.
- LAPPIN, M. R.; GEORGE, J. W.; PEDERSEN, N. C.; BARLOUGH, J. E.; MURPHY, C. J.; MORSE, L. S. Primary and Secondary *Toxoplasma gondii* Infection in Normal and Feline Immunodeficiency Virus-Infected Cats. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 5, p. 733-742, 1996b.

- LAPPIN, M. R.; GREENE, C. E.; WINSTON, S.; TOLL, S. L.; EPSTEIN, M. E. Clinical Feline Toxoplasmosis. Serological Diagnosis and Therapeutic Management of 15 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 3, n. 3, p. 139-143, 1989.
- LAPPIN, M. R.; MARKS, A.; GREENE, C. E.; COLLINS, J. K.; CARMAN, J.; REIF, J. S.; POWELL, C. C. Serological prevalence of selected infectious diseases in cats with uveitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 7, p. 1005-1009, 1992b.
- LAPPIN, M. R.; MARKS, A.; GREENE, C. E.; ROSE, B. J.; GASPER, P. W.; POWELL, C. C.; REIF, J. S. Effect of Feline Immunodeficiency Virus Infection on *Toxoplasma gondii*-specific Humoral and Cell-mediated Immune Responses of Cats with Serologic Evidence of Toxoplasmosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 2, p. 95-100, 1993.
- LAPPIN, M. R.; ROBERTS, S. M.; DAVIDSON, M. G.; POWELL, C. C.; REIF, J. S. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies and antigens in the aqueous humor of cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 7, p. 1010-1016, 1992c.
- LEVY, J. K.; LIANG, Y.; RITCHEY, J. W.; DAVIDSON, M. G.; TOMPKINS, W. A.; TOMPKINS, M. B. Failure of FIV-infected cats to control *Toxoplasma gondii* correlates with reduced IL2, IL6, and IL12 and elevated IL10 expression by lymph node T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, p. 101-111, 2004.
- LEVY, J. K.; RITCHEY, J. W.; ROTTMAN, J. B.; DAVIDSON, M. G.; LIANG, Y.; JORDAN, H. L.; TOMPKINS, W. A.; TOMPKINS, M. B. Elevated Interleukin-10 -to-Interleukin-12 Ratio in Feline Immunodeficiency Virus-Infected Cats Predicts Loss of Type 1 Immunity to *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p. 503-511, 1998.
- LIN, D.; BOWMAN, D. D. Cellular responses of cats with primary toxoplasmosis. **The Journal of Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 272-279, 1991.
- LIN, D.; BOWMAN, D. D. Macrophage functions in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 33, p. 69-78, 1992.
- LIN, D.; BOWMAN, D. D.; JACOBSON, R. H. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* antigens in aqueous and cerebrospinal fluids of cats infected with *T. gondii* and FIV. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 293-299, 1992a.
- LIN, D.; BOWMAN, D. D.; JACOBSON, R. H. Immunological Changes in Cats with Concurrent *Toxoplasma gondii* and Feline Immunodeficiency Virus Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 17-24, 1992b.

- LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; RECHE JR, A.; GERMANO, P. M. L. Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em gatos infectados pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 41-45, 1998.
- MARMOR, M.; FRIEDMAN-KIEN, A. E.; ZOLLA-PAZNER, S.; STAHL, R. E.; RUBINSTEIN, P.; STEIN, L.; WILLIAM, D. C.; KLEIN, R. J.; SPIGLAND, I. Kaposi's sarcoma in homosexual men. **Annals of Internal Medicine**, v. 100, p. 809-815, 1984.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MOSIER, D. E. Consequences of secondary or co-infections for immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 6, p. 539-544, 1994.
- NUSSENBLATT, R. B.; BELFORT, R. J. Ocular toxoplasmosis. An old disease revisited. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, p. 304-307, 1994.
- OMATA, Y.; OIKAWA, H.; KANDA, M.; MIKAZUKI, K.; NAKABAYASHI, T.; SUZUKI, N. Experimental feline toxoplasmosis: humoral immune responses of cats inoculated orally with *Toxoplasma gondii* cysts and oocysts. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 52, n. 4, p. 865-867, 1990.
- OMATA, Y.; TERADA, K.; TAKA, A.; ISAMIDA, T.; KANDA, M.; SAITO, A. Positive evidence that anti-*Toxoplasma gondii* IgA antibody exists in the intestinal tract of infected cats and exerts protective activity against the infection. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 1-11, 1997.
- O'NEIL, S. A.; LAPPIN, M. R.; REIF, J. S.; MARKS, A.; GREENE, C. E. Clinical and Epidemiological Aspects of Feline Immunodeficiency Virus and *Toxoplasma gondii* Coinfections in Cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.27, p. 211-220, 1991.
- PEDERSEN, N. C.; LEUTENEGGER, C. M.; WOO, J. Virulence differences between two field isolates of feline immunodeficiency virus (FIV-A Petaluma and FIV_C Pgammias) in young adult specific pathogen free cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, p. 53-67, 2001.
- PENA, H. F. J. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de gatos do estado de São Paulo**. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- POWELL, C. C.; LAPPIN, M. R. Clinical ocular toxoplasmosis in neonatal kittens. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 2, p. 87-92, 2001.
- REUBEL, G. H.; DEAN, G. A.; GEORGE, J. W.; BARLOUGH, J. E.; PEDERSEN, N. C. Effects of incidental infections and immune activation on disease progression in

experimentally feline immunodeficiency virus-infected cats. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 7, n. 10, p. 1003-1015, 1994.

RITCHEY, J. W.; LEVY, J. K.; BLISS, S. K.; TOMPKINS, W. A. F.; TOMPKINS, M. B. Constitutive expression of types 1 and 2 cytokines by alveolar macrophages from feline immunodeficiency virus-infected cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, p. 83-100, 2001.

ROGHMANN, M. C.; FAULKNER, C. T.; LEFKOWITZ, A. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 790-792, 1999.

SACKS, J. J.; ROBERTO, R. R.; BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **Journal of the American Medical Association**, v. 248, p. 1728-1732, 1982.

SCHARTON-KERSTEN, T.; DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R.; SHER, A. Role of IL-12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Research in Immunology**, v. 146, p. 539-545, 1995.

SHER, A.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor- α . **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 9, p. 3982-3989, 1993.

SHIMOJIMA, M.; NISHIKAWA, Y.; MIYAZAWA, T.; TOHYA, Y.; AKASHI, H. Phenotypic changes in CD8⁺ peripheral blood lymphocytes in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1171-1176, 2003.

SHUHAIBER, S.; KOREN, G.; BOSKOVIC, R.; EINARSON, T. R.; SOLDIN, O. P.; EINARSON, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among veterinary staff in Ontario, Canada (2002): implications for teratogenic risk. **BMC Infectious Diseases**, v. 3, p. 1-5, 2003.

STILES, J.; PRADE, R.; GREENE, C. E. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 3, p. 264-267, 1996.

STRAY-PEDERSEN, B.; LORENTZEN-STYR, A. M. Epidemiological aspects of *Toxoplasma* infections among women in Norway. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 59, p. 323-326, 1980.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, p. 414-416, 2003.

- SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3955-3959, 1991.
- SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, p. 516-518, 1988.
- TESSELAAR, K.; ARENS, R.; VAN SCHIJNDEL, G. M. W.; BAARS, P. A.; VAN DER VALK, M. A.; BORST, J.; VAN OERS, M. H. J.; VAN LIER, R. A. W. Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 49-54, 2003.
- TEUTSCH, S. M.; JURANEK, D. D.; SULZER, A. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **The New England Journal of Medicine**, v. 300, p. 695-699, 1979.
- TORTEN, M.; FRANCHINI, M.; BARLOUGH, J. E. Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 65, p. 2225-2230, 1991.
- VOLKMAN, S. K.; HARTL, D. L. A game of cat and mouse. **Science**, v. 299, p. 353-354, 2003.
- WALLACE, M. R.; ROSSETTI, R. J.; OLSON, P. E. Cats and toxoplasmosis risk in HIV-infected adults. **Journal of the American Medical Association**, v. 269, p. 76-77, 1993.
- WEIGEL, R. M.; DUBEY, J. P.; DYER, D. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms on Illinois. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 793-798, 1999.
- WILLIS, A. M. Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, p. 971-986, 2000.
- WITT, C. J.; MOENCH, T. R.; GITTELSON, A. M.; BISHOP, B. D.; CHILDS, J. E. Epidemiologic observations on feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* coinfection in cats in Baltimore, Md. **Journal of the American Medical Association**, v. 194, n. 2, p. 229-233, 1989.
- WOLF, S. F.; TEMPLE, P. A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, R.; FITZ, L.; FERENZ, C.; HEWICK, R. M.; KELLEHER, K.; HERRMANN, S. H.; CLARK, S. C.; AZZONI, L.; CHAN, S. H.; TRINCHIERI, G.; PERUSSIA, B. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 9, p. 3074-3081, 1991.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Animal número 1 do Grupo I (VIF+TOXO+) em gaiola de inox individual. São Paulo, 2002-2003

APÊNDICE B - Inóculo de *T. gondii* composto de encéfalo, musculatura e vísceras de camundongo Suíço Albino. São Paulo, 2002-2003

APÊNDICE C - Decalque de encéfalo de camundongo Suíço Albino demonstrando dois cistos de *T. gondii* em objetiva de 10x (A) e 40x (B). São Paulo, 2002-2003

APÊNDICE D - A – Oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii*. Aumento de 40x. B – Oocisto não esporulado e C – Oocisto esporulado de *T. gondii* eliminados pelo gato B para a obtenção de oocistos frescos. Aumento de 100x. São Paulo, 2002-2003

APÊNDICE E - Procedimento de sondagem gástrica em camundongos Suiço Albino. A: Visualização comparativa entre a dimensão da sonda e o corpo do camundongo, B: Passagem da sonda no camundongo. São Paulo, 2002-2003

APÊNDICE F - Citograma da população de leucócitos de acordo com tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) do gato número 1 do Grupo I (VIF+TOXO+) antes da inoculação de *T. gondii*. A área marcada (GATE) indica a população considerada para efeito de análise. São Paulo, 2002-2003

APÊNDICE G - Valores individuais de leucócitos / mm³ de felinos dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Felino	Pré	3 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi	49 dpi	56 dpi	63 dpi	70 dpi	77 dpi	84 dpi
Grupo I (VIF + / TOXO +)														
1	16.600	12.150	18.750	17.650	17.800	17.650	19.950	15.950	18.200	21.700	20.400	20.650	17.350	18.950
2	11.650	10.800	10.400	11.250	10.400	12.000	12.050	9.450	12.150	16.600	27.100	9.950	9.050	9.050
3	15.600	13.650	13.400	13.600	13.800	14.750	16.650	12.600	14.450	18.050	37.250	13.300	9.300	11.450
4	13.550	10.150	7.350	12.850	13.600	13.350	10.100	9.100	11.650	13.800	10.500	10.400	7.900	13.900
5	16.000	14.700	11.650	19.300	12.250	14.650	10.900	16.550	10.900	9.700	10.100	12.600	12.500	17.100
6	17.250	17.750	21.200	26.150	22.400	20.950	14.050	15.300	11.350	12.200	17.350	13.050	18.300	18.650
7	12.150	13.450	9.550	11.800	24.650	18.850	16.200	15.500	15.800	15.250	12.500	15.000	10.950	10.750
Grupo II (VIF - / TOXO +)														
1	3.050	6.900	10.650	10.800	14.450	13.900	14.650	8.050	13.800	9.950	22.800	12.300	11.350	11.200
2	10.300	8.400	9.850	8.650	13.850	7.600	9.950	7.150	9.150	7.050	12.200	11.050	7.550	7.800
3	11.450	10.850	9.450	15.550	12.000	11.400	13.250	11.350	14.100	21.500	15.650	19.900	11.550	10.900
4	11.050	13.050	11.350	11.950	13.850	16.250	18.100	9.350	15.350	11.000	17.450	18.250	13.900	14.750
5	11.950	11.850	10.300	13.200	9.600	15.150	10.200	13.600	11.200	11.000	12.650	10.850	10.600	10.000
6	9.800	10.150	11.700	18.350	10.000	12.400	13.250	12.750	16.200	11.750	12.000	13.450	10.300	14.700
7	13.150	8.700	9.050	14.100	11.650	13.950	14.600	9.100	12.950	13.550	12.000	9.700	12.900	13.000
Grupo III (VIF + / TOXO -)														
1	13.000	18.150	17.350	14.950	13.750	16.100	24.000	22.850	19.100	15.650	15.950	14.300	13.600	23.500
2	11.150	12.950	11.800	12.000	12.300	13.700	9.050	8.700	16.100	11.950	8.300	8.950	10.300	8.000
3	24.600	20.900	25.700	30.550	23.450	23.900	17.550	26.100	20.500	15.616	21.000	20.750	24.150	24.900
4	12.950	11.250	10.250	6.850	16.650	8.200	8.250	9.500	10.150	12.750	24.150	19.350	23.100	19.700
5	7.700	6.850	9.500	6.000	14.150	9.400	8.800	6.350	10.950	6.000	10.000	7.500	3.950	5.850
6	13.400	10.100	14.750	12.300	13.050	14.600	18.700	13.350	13.800	12.550	15.100	13.950	15.050	10.200
7	18.900	18.450	13.250	17.700	14.050	15.250	9.500	13.000	8.450	19.150	15.300	12.650	14.050	11.100
Grupo IV (VIF - / TOXO -)														
1	10.300	13.200	18.450	19.150	18.600	13.200	12.950	13.950	12.500	16.100	13.700	12.300	15.250	13.750
2	7.650	5.950	5.600	5.450	6.000	7.800	5.750	5.450	5.100	5.450	5.800	5.300	7.500	6.700
3	11.150	12.200	15.000	11.950	14.650	10.900	12.000	11.250	11.750	10.350	17.950	13.850	12.550	12.950

APÊNDICE H - Valores individuais de neutrófilos segmentados / mm³ de felinos dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Felino	Pre	3 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi	49 dpi	56 dpi	63 dpi	70 dpi	77 dpi	84 dpi
Grupo I (VIF + / TOXO +)														
1	10.956	8.141	9.188	9.002	7.476	9.531	10.973	11.484	9.282	14.105	11.832	10.738	9.196	12.507
2	5.592	5.184	6.760	5.625	5.616	7.440	6.869	3.308	7.533	11.786	21.138	6.468	6.154	7.059
3	10.296	9.282	8.174	8.160	8.280	6.048	8.325	6.804	7.948	11.011	29.428	7.182	4.278	4.008
4	4.201	3.857	1.617	5.269	4.216	3.204	2.525	2.184	2.796	2.760	3.150	2.288	2.291	9.869
5	10.560	6.909	6.757	12.352	6.493	10.109	6.540	8.937	5.123	3.104	5.252	5.670	5.625	12.312
6	12.075	13.490	16.536	21.966	17.248	16.132	10.116	9.792	7.378	5.002	10.063	9.135	12.810	15.666
7	8.262	11.029	3.820	7.198	22.432	15.269	10.854	11.780	12.640	8.845	8.250	9.450	8.103	8.278
GRUPO VIF - / TOXO +														
1	1.464	3.795	5.964	7.452	7.514	7.506	8.937	5.394	8.280	5.771	14.592	7.257	5.221	5.600
2	6.283	5.544	6.600	5.709	9.418	3.952	5.075	4.147	4.392	4.089	6.954	7.404	3.624	4.290
3	7.099	8.355	5.103	9.952	6.600	6.726	8.348	7.151	8.319	17.630	8.608	15.323	7.392	6.867
4	4.310	8.352	6.697	3.585	7.064	11.213	11.946	3.179	6.908	5.720	5.933	11.498	7.228	10.768
5	8.246	8.651	4.738	9.108	7.008	9.242	6.732	9.928	8.512	7.040	10.500	6.619	5.618	7.200
6	6.468	4.872	6.435	9.909	5.200	6.448	8.083	3.188	9.072	7.050	7.680	9.281	7.004	11.025
7	7.627	5.046	6.969	7.896	7.689	9.486	9.344	5.733	7.123	7.317	7.920	6.014	8.256	7.280
GRUPO VIF + / TOXO -														
1	8.060	9.801	10.931	9.867	6.600	8.694	11.760	17.823	9.741	8.921	9.092	8.151	9.112	15.980
2	2.899	4.662	5.074	4.320	2.952	9.316	3.711	4.437	10.626	6.573	3.652	5.639	2.163	4.000
3	19.434	15.466	22.873	23.524	15.946	20.554	13.514	21.141	11.275	15.616	15.330	16.393	17.630	17.679
4	8.418	7.650	5.945	2.740	13.320	3.690	4.043	4.560	7.511	9.180	19.079	17.029	18.249	14.578
5	4.928	5.138	6.270	3.060	11.175	5.922	4.488	2.731	6.242	3.660	7.300	5.175	2.370	3.569
6	6.968	5.151	6.343	4.920	6.395	8.906	10.472	8.010	6.072	8.283	8.909	8.789	7.074	6.936
7	15.120	15.129	11.395	14.160	11.662	13.115	7.030	9.880	6.084	14.937	12.087	9.488	10.819	8.214
GRUPO VIF - / TOXO -														
1	3.914	6.204	12.915	13.214	12.834	6.072	8.677	5.859	6.750	11.592	9.453	7.749	11.285	9.213
2	4.284	2.797	2.744	2.780	3.240	4.914	2.358	2.725	1.938	6.107	2.668	2.756	3.975	3.685
3	6.579	5.612	7.800	4.780	10.988	6.758	9.360	7.313	6.463	2.780	14.360	11.219	6.777	10.749

APÊNDICE I - Valores individuais de linfócitos / mm³ de felinos dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Felino	Pré	3 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi	49 dpi	56 dpi	63 dpi	70 dpi	77 dpi	84 dpi
Grupo I (VIF + / TOXO +)														
1	4.316	3.281	8.250	8.119	9.612	7.766	8.379	2.712	7.462	6.944	6.324	8.467	6.593	4.927
2	5.825	5.292	3.328	4.838	4.576	4.320	4.941	5.765	4.496	4.150	5.149	3.184	2.534	1.539
3	4.212	3.413	4.690	4.896	5.106	7.965	7.992	5.292	5.925	6.859	7.078	5.719	4.836	6.756
4	8.401	5.583	5.366	7.067	8.840	9.479	6.767	6.006	8.621	10.350	7.035	7.696	4.977	2.780
5	4.800	6.909	4.194	6.562	5.022	3.955	3.815	5.793	5.777	6.014	4.141	6.552	6.375	3.933
6	3.623	3.195	3.180	2.354	3.584	3.352	2.389	3.672	3.292	6.710	6.073	2.349	3.660	1.865
7	3.766	2.287	5.539	3.776	1.725	3.581	4.698	2.635	2.370	5.490	4.000	4.950	2.847	2.043
GRUPO VIF - / TOXO +														
1	1.403	2.622	3.515	2.484	6.214	6.116	4.835	2.093	4.692	3.980	7.752	4.551	5.789	4.704
2	1.236	2.016	1.773	2.076	3.601	2.964	3.383	1.788	3.477	1.833	4.026	1.989	3.322	2.418
3	2.748	1.844	3.591	4.510	4.440	4.218	3.843	3.405	4.089	3.010	5.947	3.383	3.119	3.706
4	6.409	4.307	3.746	8.007	6.094	4.062	5.068	5.704	7.368	3.740	9.947	5.840	6.255	3.835
5	3.226	2.726	4.532	3.432	2.208	4.848	2.448	2.856	2.128	3.300	1.645	3.689	4.346	2.500
6	2.646	4.974	4.446	7.891	4.400	4.960	4.505	8.288	5.346	3.290	3.480	3.228	2.781	2.499
7	3.682	3.132	1.629	5.781	3.611	2.790	4.088	2.912	4.662	4.743	2.880	2.716	3.225	4.290
GRUPO VIF + / TOXO -														
1	3.640	7.623	5.725	4.336	6.050	6.762	10.560	3.428	8.786	6.417	6.221	5.291	3.400	6.110
2	7.136	6.734	6.018	6.240	7.995	3.425	4.253	3.219	4.830	4.780	4.067	2.685	7.519	3.600
3	3.198	2.508	1.799	4.888	3.283	1.912	2.457	1.044	6.355	4.880	3.150	1.868	4.830	1.992
4	2.978	2.813	3.690	2.946	1.832	3.198	2.640	3.705	1.523	2.678	3.864	968	4.158	4.531
5	1.848	1.301	2.565	2.160	1.556	2.538	3.344	2.858	3.723	1.380	1.200	1.425	869	1.346
6	6.030	4.545	8.260	7.134	6.264	4.818	7.106	4.272	7.038	4.016	5.134	4.743	6.622	2.448
7	2.646	2.029	927	2.478	1.264	1.220	1.235	1.560	1.268	3.639	1.836	2.151	1.967	1.776
GRUPO VIF - / TOXO -														
1	5.356	5.940	4.428	5.553	4.836	6.468	3.626	7.533	4.125	3.542	3.836	3.198	3.050	3.713
2	1.989	2.737	2.240	2.125	2.220	2.028	2.933	2.126	2.703	2.126	2.610	1.961	2.550	2.211
3	3.679	5.978	6.300	6.214	3.369	3.379	2.160	3.375	4.818	3.623	3.052	2.493	5.020	1.684

APÊNDICE J - Valores individuais de linfócitos T CD4+ / mm³ de felinos dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Felino	Pré	3 dpi	7 dpi	14 dpi	28 dpi	42 dpi	56 dpi	70 dpi	84 dpi
GRUPO VIF - / TOXO -									
1	469	562	615	561	692	305	912	976	365
2	881	612	307	726	688	455	522	552	198
3	409	342	416	637	1006	738	747	704	795
4	1493	909	1266	1538	2147	1115	1821	1256	570
5	882	1310	743	1253	614	1283	1058	972	652
6	564	591	323	190	715	880	1180	424	389
7	390	327	455	477	514	286	622	653	157
GRUPO VIF - / TOXO +									
1	407	800	1019	726	1413	373	481	851	990
2	271	226	474	646	486	401	210	464	426
3	769	209	760	1301	1140	1025	616	790	693
4	1289	1062	858	1810	870	1036	674	1056	738
5	837	542	1017	886	1128	585	607	626	319
6	582	1519	966	2373	1206	1750	764	867	571
7	778	417	301	911	584	447	799	548	808
GRUPO VIF + / TOXO -									
1	483	1114	1121	619	1079	521	923	761	863
2	1372	1419	991	983	491	328	638	318	414
3	311	1254	310	476	116	84	525	164	280
4	323	536	659	383	343	628	388	118	761
5	647	154	659	411	449	320	248	353	143
6	633	516	1058	708	562	461	460	559	240
7	354	384	165	413	187	165	515	228	180
GRUPO VIF - / TOXO -									
1	787	1205	1067	1171	267	1708	745	669	815
2	436	1146	723	509	262	417	540	214	321
3	822	1723	1780	1649	744	826	694	613	395

APÊNDICE L - Valores individuais de linfócitos T CD8+ / mm³ de felinos dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Felino	Pré	3 dpi	7 dpi	14 dpi	28 dpi	42 dpi	56 dpi	70 dpi	84 dpi
GRUPO VIF - / TOXO -									
1	573	575	992	1555	1175	555	1325	1602	764
2	979	793	571	881	1035	499	788	638	235
3	500	595	803	1106	1705	1129	1523	1278	1430
4	1213	549	1110	1528	2235	715	1842	1162	597
5	667	985	620	1209	587	1083	947	825	496
6	415	272	144	88	385	484	697	217	162
7	332	346	341	379	681	445	830	994	159
GRUPO VIF - / TOXO +									
1	100	615	573	491	1343	233	321	577	735
2	148	153	360	576	411	281	103	338	325
3	330	71	296	598	553	456	364	378	302
4	790	488	473	1404	660	836	458	943	582
5	349	288	519	471	588	244	313	344	184
6	319	527	596	1288	795	1085	455	570	341
7	490	145	172	614	353	392	576	355	723
GRUPO VIF + / TOXO -									
1	230	1061	840	576	886	467	888	595	840
2	1137	1453	1078	1358	617	447	904	311	366
3	108	527	358	730	145	77	514	129	328
4	284	432	551	493	251	551	438	99	633
5	298	359	284	243	226	167	123	162	66
6	976	1378	2075	1556	1222	1009	949	1101	371
7	226	411	138	378	169	154	417	323	115
GRUPO VIF - / TOXO -									
1	631	1013	900	880	234	1247	647	503	547
2	128	159	179	155	113	134	246	55	146
3	503	1146	1119	1019	385	523	535	297	236

APÊNDICE M - Valores individuais da relação de linfócitos T CD4/CD8 de felinos dos Grupos I, II, III e IV durante o período experimental de 84 dias. São Paulo, 2002-2003

Felino	Pré	3 dpi	7 dpi	14 dpi	28 dpi	42 dpi	56 dpi	70 dpi	84 dpi
GRUPO VIF - / TOXO -									
1	0,82	0,98	0,62	0,61	0,59	0,55	0,69	0,61	0,48
2	0,9	0,77	0,54	0,82	0,66	0,91	0,66	0,86	0,84
3	0,82	0,58	0,52	0,58	0,59	0,65	0,49	0,55	0,56
4	1,23	1,65	1,14	1,01	0,96	1,56	0,99	1,08	0,96
5	1,32	1,33	1,2	1,04	1,05	1,18	1,12	1,18	1,32
6	1,36	2,17	2,24	2,17	1,86	1,82	1,69	1,96	2,4
7	1,17	0,95	1,33	1,26	0,75	0,64	0,75	0,66	0,99
GRUPO VIF - / TOXO +									
1	4,08	1,3	2,05	1,48	1,05	1,5	1,5	1,48	1,35
2	1,83	1,48	1,96	1,12	1,18	2,03	2,03	1,38	1,31
3	2,33	2,93	2,86	2,18	2,06	1,7	1,7	2,09	2,29
4	1,63	2,17	1,84	1,29	1,32	1,47	1,47	1,12	1,27
5	2,4	1,88	2,64	1,88	1,92	1,94	1,94	1,82	1,73
6	1,82	2,88	2,12	1,84	1,52	1,68	1,68	1,52	1,68
7	1,59	2,88	2,37	1,48	1,66	1,39	1,39	1,55	1,12
GRUPO VIF + / TOXO -									
1	2,1	1,05	1,35	1,08	1,22	1,04	1,04	1,28	1,03
2	1,21	0,98	0,88	0,72	0,8	0,71	0,71	1,02	1,13
3	2,89	2,38	1,1	0,65	1,37	1,02	1,02	1,28	0,85
4	1,14	1,24	1,17	0,78	0,8	0,88	0,88	1,19	1,2
5	2,17	0,43	3,12	1,69	1,99	2,01	2,01	2,18	2,16
6	0,65	0,37	0,38	0,45	0,46	0,48	0,48	0,51	0,65
7	1,57	0,94	1,16	1,09	1,1	1,23	1,23	0,71	1,56
GRUPO VIF - / TOXO -									
1	1,25	1,19	1,06	1,33	1,14	1,15	1,15	1,33	1,49
2	3,41	7,2	8,47	3,28	2,33	2,19	2,19	3,92	2,19
3	1,64	1,5	1,59	1,62	1,93	1,3	1,3	2,06	1,67

ANEXO

ANEXO**ANEXO A: Solução de sacarose****Solução A:**

Açúcar 128g

Água destilada 100mL

Corresponde à densidade de 1,275.

Solução B:

Três partes da Solução A

Uma parte de água destilada

Corresponde à densidade de 1,205.

ANEXO B: Solução salina tamponada com fosfato (PBS) NaCl 0,146M, PO₄ 0,01M, pH 7,2

NaCl 8,523g

Na₂HPO₄. 12H₂O 2,764g

NaH₂PO₄. H₂O 0,314g

Água bidestilada qsp 1.000mL

Conservar à temperatura de 4°C.