
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MEDICAMENTOS IMUNOSSUPRESSORES NA REATIVAÇÃO DA TOXOPLASMOSE CRÔNICA MURINA

Fabiana Santiago Aleixo, Fábio de Faria Vasconcelos, Joanna D'arc Aparecida Herzog Soares, Ruy de Souza Lino Júnior e Marco Túlio Antônio Garcia-Zapata¹

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o potencial de reativação da toxoplasmose crônica em modelo murino imunocomprometido. Para tanto, camundongos BALB/c foram infectados por via oral com 20 cistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii* e, após 60 dias, foi iniciado o tratamento com medicamentos imunossupressores: azatioprina, dexametasona (ambos por via oral) e acetato de cortisona (via subcutânea), sozinhos ou em associação. O tratamento foi mantido por um período de 28 dias, posteriormente os animais foram eutanasiados e tiveram seu sangue e órgãos retirados para exames sorológicos e histopatológicos. O uso de dexametasona ou azatioprina, isoladas ou associadas, não causou sinais de reativação detectáveis por exames sorológicos, histopatológicos ou clínicos. Entretanto, quando foram associados ao acetato de cortisona, esses medicamentos levaram a um quadro clínico sugestivo de reativação com lesões epidérmicas em 62,5% dos camundongos. Os resultados do presente estudo sugerem que, com o modelo murino utilizado, a reativação da toxoplasmose crônica sofre grande influência do tratamento imunossupressor proposto. Nestes casos, os sinais clínicos indicativos da reativação crônica toxoplásmica podem estar presentes mesmo antes da detecção do ocorrido por métodos sorológicos e histopatológicos.

DESCRITORES: *Toxoplasma gondii*. Cepa ME-49. Medicamentos imunossupressores. Reativação.

ABSTRACT

Evaluation of the effect of immunosuppressive drugs in the reactivation of chronic murine toxoplasmosis.

This study evaluated the potential for reactivation of chronic toxoplasmosis in an immunocompromised murine model. To this end, BALB/c mice were orally infected with 20

1 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás.

Endereço para correspondência: Fabiana Santiago Aleixo, Laboratório de Protozoologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- Rua 235-sn-Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil, CEP 74605-050. E-mail: f.aleixoalves@yahoo.com.br

Recebido para publicação em: 16/9/2011. Revisto em: 17/4/2012. Aceito em: 21/6/2012.

cysts of *Toxoplasma gondii* ME-49 strain. After 60 days, the treatment with orally administered immunosuppressive drugs, such as azathioprine and dexamethasone, and cortisone acetate (administered by subcutaneous route) alone or in combination, started. The treatment was maintained for 28 days and afterwards the animals were euthanized and had their blood and organs removed for serological, histopathological and clinical examinations. When the drugs were associated to cortisone acetate, the clinical manifestations presented by the mice suggested reactivation due to epidermal lesions in 62.5% of the mice when compared to the control group. The results from this study suggest that with the murine model used, the chronic toxoplasmosis reactivation is greatly influenced by the immunosuppressive treatment proposed. In these cases, the clinic manifestations indicative of chronic toxoplasmosis reactivation may be present even before its detection by serological and histopathological methods.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*. ME-49 strain. Immunosuppressive drugs. Reactivation.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário comum no ser humano e em muitos outros animais de sangue quente. Os gatos domésticos e outros felídeos atuam como hospedeiros definitivos e são capazes de disseminar oocistos de *T. gondii* por meio de suas fezes (Tenter et al., 2000). Este parasito apresenta vasta distribuição geográfica e excepcional resistência, sobrevivendo a adversidades ambientais como variação de temperatura e umidade.

A contaminação ocorre após a ingestão de cistos teciduais de animais infectados ou por meio de oocistos presentes no solo, que constituem uma fonte contínua de infecção para humanos e outros animais (Devada et al., 1998). Após a ingestão dos oocistos, ocorre a liberação dos esporozoítas que infectam o epitélio intestinal do hospedeiro intermediário e produzem as formas assexuadas taquizoítas, ocorrendo, assim, uma infecção aguda. Posteriormente, na infecção crônica, as formas taquizoítas passam a bradizoítas. Os taquizoítas penetram em células nucleadas, multiplicam-se rapidamente rompendo a célula hospedeira e liberando novos taquizoítas, que infectarão as células adjacentes causando uma infecção sistêmica. Após alguns dias ocorre a formação de cistos teciduais contendo bradizoítas que é o outro estágio do parasito, assim este permanece viável por vários anos, muitas vezes por toda a vida do hospedeiro (Kawazoe, 2003; Dubey, 1998; Dubey, 2004).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção caracteriza-se por uma breve fase aguda com proliferação de taquizoítas, posteriormente convertida em um estágio latente caracterizado por um lento crescimento de bradizoítas no interior de cistos teciduais, localizados principalmente no cérebro e músculo esquelético (Djurkovic-Djakovic & Milenkovic, 2001). Se a relação entre o sistema imune do hospedeiro e o parasito sofrer um desequilíbrio, uma nova proliferação do parasito pode ocorrer e levar à reagudização do quadro de infecção crônica (Porter & Sande, 1992).

Com o surgimento da AIDS e o uso de terapias imunossupressoras intensas para tratamento de doenças malignas ou sistêmicas, bem como para o tratamento pré/pós- transplantes de órgãos e tecidos, tem-se estabelecido uma população de

indivíduos imunocomprometidos suscetíveis à reativação de patógenos oportunistas, incluindo o *T. gondii* (Bernsteen et al., 1999). Infecções por *T. gondii* são relatadas em pacientes submetidos a transplante cardíaco (Anthuber et al., 1991), renal (Renoult et al., 1991), hepático (Kusne et al., 1986) e de medula óssea (Derouin et al., 1992). Provavelmente os pacientes adoeceram por causa da reativação de cistos latentes de *T. gondii* nos receptores, embora a infecção primária possa ser causada por transmissão do parasito em transplante de órgãos (Renoult et al., 1991).

O objetivo deste trabalho foi avaliar uma possível reativação da toxoplasmose crônica murina após utilização de medicamentos imunossupressores por meio da análise das alterações clínicas, sorológicas e histopatológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados, neste trabalho, camundongos da linhagem BALB/c machos, pesando aproximadamente 20g e com 40 dias de vida, obtidos do biotério do IPTSP/UFG e nele mantidos. A linhagem BALB/c foi selecionada por ser classificada como resistente à infecção crônica pela cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii* (Suzuki et al., 1993), visto que o uso de modelos murinos extremamente susceptíveis ao parasito, como os camundongos C57BL/6 e CBA/Ca, pode levar ao surgimento de reativação da doença ou de lesões mesmo antes da imunossupressão (Fux et al., 2003). Outro fator importante na escolha da linhagem de camundongos foi o fato dos BALB/c não apresentarem mudanças inflamatórias no encéfalo durante a fase crônica da infecção (Suzuki et al., 1993), o que facilita o reconhecimento de possíveis lesões causadas pela reativação da infecção após o tratamento imunossupressor.

Cepa de Toxoplasma gondii: Foi selecionada para este estudo a cepa ME-49 por ser bem caracterizada na literatura e se enquadrar no tipo II, ter comportamento reconhecidamente cistogênico (Djurkovic-Djakovic et al., 2006) e ser mantida em estoque no laboratório de Protozoologia do IPTSP/UFG.

Infecção experimental: Foi realizado primeiramente um estudo na forma de curva de virulência, objetivando determinar o maior inóculo de cistos capaz de estabelecer a infecção crônica por *T. gondii* sem provocar a morte do camundongo (Sumyuen et al., 1996). Para tanto, foram utilizados 20 camundongos divididos em quatro grupos com cinco animais cada, que receberam 7, 15, 20 e 30 cistos por via oral (gavagem). Os animais foram observados diariamente por um período de oito semanas, quando a infecção crônica é considerada estabelecida (Djurkovic-Djakovic & Milenkovic, 2001) para o surgimento de sintomas clínicos de toxoplasmose aguda ou eventual morte. Ficou determinado que 20 cistos seria o maior número capaz de induzir infecção crônica, confirmada pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com mortalidade nula. Na fase seguinte do estudo, foram administrados medicamentos imunossupressores por um período de 28 dias em grupos de camundongos BALB/c cronicamente infectados com 20 cistos, assim distribuídos:

Terapia com medicamentos imunossupressores administrados por via oral:

Grupo A: Dexametasona em dosagem de 2,5mg/kg/dia, três vezes por semana em dias alternados.

Grupo B: Azatioprina em dosagem de 10mg/kg/dia, cinco vezes por semana em dias consecutivos.

Grupo C: Azatioprina associada com Dexametasona nos regimes acima citados.

Grupo D: Azatioprina 10mg/kg/dia, cinco vezes por semana em dias seguidos, associada com Dexametasona 2,5mg/kg/dia, três vezes por semana em dias alternados. Também foi administrado Acetato de cortisona 50mg duas vezes por semana, apenas este último por via subcutânea.

Concomitantes aos grupos citados acima, para cada terapia proposta foram mantidos grupos com cinco camundongos do grupo controle divididos em:

Controle 1: animais infectados cronicamente com ou sem administração de soro fisiológico por via oral;

Controle 2: animais não infectados em uso das terapias imunossupressoras descritas anteriormente;

Controle 3: animais não infectados sem receber qualquer tratamento, porém mantidos no mesmo ambiente que os demais.

Para prevenir uma possível infecção bacteriana, foi adicionada Amoxicilina (1g/L) na água oferecida aos animais durante o tratamento. Todos os camundongos foram observados diariamente para conferir o surgimento de sintomas de toxoplasmose aguda. Concluída a análise clínica, os animais foram eutanasiados e necropsiados para retirada de órgãos (fígado, baço, pulmão, coração e cérebro) para estudos histopatológicos. O sangue foi retirado por punção cardíaca para estudo sorológico por meio da RIFI.

Avaliação histopatológica

As vísceras dos animais experimentais e dos controles foram coletadas durante a necrópsia dos camundongos e fixadas em formalina 10% tamponada com fosfatos. O material foi processado pelo método de inclusão em parafina, as lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina e observadas no microscópio de luz. As alterações histopatológicas foram analisadas quanto à presença ou ausência de alterações nas células, no interstício, na circulação, no crescimento celular e na inflamação. A intensidade dos processos patológicos gerais foi analisada obedecendo aos seguintes critérios: ausente (0%), discreta (1% - 25%), moderada (26% - 50%) e acentuada (acima de 51%), de acordo com o comprometimento do corte analisado.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Os soros dos camundongos foram submetidos à RIFI conforme o preconizado por Camargo (2001). Resumidamente, estes foram diluídos em salina

tamponada (PBS), acomodados em lâminas sensibilizadas com taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (Bioshop®), que foram acondicionadas em câmara úmida, incubadas, lavadas em PBS e secas. Em seguida foram adicionados os conjugados anti-IgG e anti-IgM previamente diluídos (conjugado anticadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA®). As lâminas foram então novamente incubadas, lavadas, secas, cobertas com glicerina tamponada e observadas no microscópio de imunofluorescência.

Todos os soros passaram por uma triagem inicial com diluições de 1/16 para IgG e 1/8 para IgM, visto que estas são comumente utilizadas como referência na identificação de toxoplasmose em mamíferos diversos (Handman & Remington, 1980; Da Silva et al., 2002). As amostras consideradas positivas foram então testadas em diluições ao quádruplo para determinar os títulos de anticorpos. Durante todo o procedimento, foram utilizados controles positivos e negativos.

RESULTADOS

Estabelecimento da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* com base na mortalidade de animais e na contagem de cistos

O inóculo de 30 cistos apresentou letalidade de 80%; nos demais inóculos com 7, 15 e 20 cistos, a sobrevivência foi de 100%. No modelo proposto, os animais inoculados com 20 cistos formaram o grupo com maior número de cistos sem morte, ficando assim estabelecida esta quantidade como a ideal para o experimento (Figura 1).

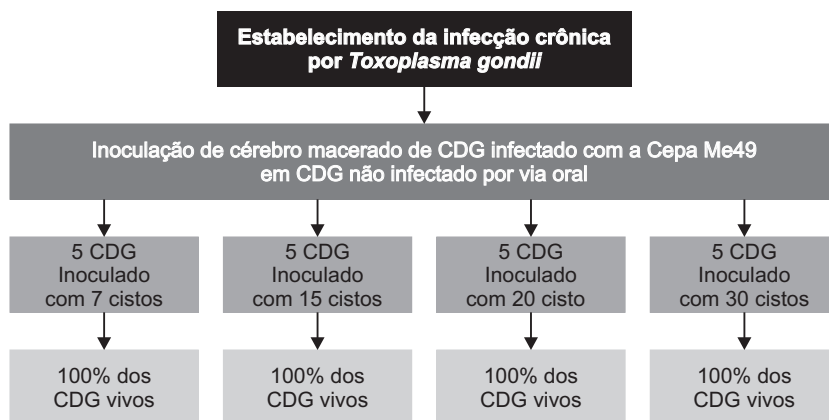


Figura 1. Determinação do número máximo de cistos utilizados no estabelecimento da infecção crônica, com mortalidade nula durante oito semanas (CDG= camundongo BALB/c).

Sorologia pela RIFI de todos os camundongos sobreviventes

Os camundongos BALB/c que sobreviveram tiveram o soro analisado pela RIFI e não apresentaram títulos de IgM, porém todos apresentaram títulos de IgG, confirmando-se, dessa forma, a infecção crônica pelo método sorológico. A relação entre o número de cistos inoculados e a titulação para IgG dos animais está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1. Sorologia dos grupos de camundongos BALB/c infectados cronicamente com *Toxoplasma gondii* e tratados com terapia imunossupressora proposta: Grupo A- Dexametaona; Grupo B- Azatioprina; Grupo C- Azatioprina + Dexametasona; Grupo D - Azatioprina + Dexametasona + Acetato de cortisona

Grupo A	Cdg1	Cdg2	Cdg3	Cdg4	Cdg5	Cdg6	Cdg7	Cdg8
IgG 1/8	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/16	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/64	-	+	-	-	-	-	-	-
Grupo B	Cdg1	Cdg2	Cdg3	Cdg4	Cdg5	Cdg6	Cdg7	Cdg8
IgG 1/8	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/16	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/64	+	-	-	-	-	-	-	-
Grupo C	Cdg1	Cdg2	Cdg3	Cdg4	Cdg5	Cdg6	Cdg7	Cdg8
IgG 1/8	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/16	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/64	-	-	-	+	-	-	-	-
Grupo D	Cdg1	Cdg2	Cdg3	Cdg4	Cdg5	Cdg6	Cdg7	Cdg8
IgG 1/8	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/16	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG 1/64	+	-	-	-	+	-	-	-

RIFI do soro dos animais do grupo controle

Foi utilizado o soro dos camundongos do grupo controle infectados e não tratados (controle 1) para o estabelecimento de um parâmetro que, posteriormente,

foi usado para comparação com a sorologia dos camundongos infectados e tratados com os medicamentos imunossupressores. Foram encontrados anticorpos anti *T. gondii* em todos os camundongos infectados nos soros analisados, confirmando a infecção crônica.

RIFI do soro dos animais submetidos ao tratamento imunossupressor

Nos 32 camundongos infectados com 20 cistos cada e tratados com os medicamentos imunossupressores nas dosagens, vias e esquemas propostos, não foi encontrada variação na titulação, em comparação com aquela usada como parâmetro (infectado e não tratado), que pudesse sugerir reativação da infecção crônica.

Avaliação clínica de camundongos tratados com os medicamentos imunossupressores

Durante a administração das terapias imunossupressoras nos animais infectados e também nos controles, não houve morte de camundongos, assim como não foram encontrados indícios de ação tóxica dos medicamentos.

Nos três primeiros grupos avaliados (A, B e C), não houve sintomatologia que pudesse caracterizar um quadro de reativação clínica. Porém, no grupo D, que recebeu a associação de Dexametasona, Azatioprina e acetato de cortisona, cinco dos oito camundongos (62,5%) apresentaram alterações epidérmicas (com perda parcial ou total de pelos) que poderiam sugerir um quadro de alopecia e ainda uma possível reativação da toxoplasmose em razão do aparecimento de pelos arrepiados, diarreia, emagrecimento e dor (quando manuseados), assim como pela falta de apetite, por comparação com os grupos controle.

Estudo histopatológico de órgãos de camundongo

Pela análise histopatológica realizada nos órgãos dos camundongos infectados e tratados, não foram encontradas alterações condizentes com quadro de reativação de toxoplasmose. Não foram encontradas alterações histopatológicas nos grupos controle que foram submetidos aos medicamentos, assim como não foi detectada a presença de cistos de *T. gondii*.

DISCUSSÃO

O presente trabalho utilizou modelo de infecção crônica e terapia imunossupressora ainda não encontrado na literatura e objetivou simular o curso natural da infecção toxoplásmica. Para tanto, foi utilizada a cepa ME-49 por estabelecer a infecção crônica e ser responsável pela maioria dos casos de reativação da infecção por *T. gondii* em seres humanos (Howe et al., 1997). A

via de infecção oral foi selecionada por ser considerada de maior importância para a rota de transmissão do parasito (Dubey and Beattie, 1988). A escolha do regime imunossupressor seguiu o mesmo princípio, sendo selecionados medicamentos comumente utilizados na clínica humana (Sumyuen et al., 1996). O tempo de tratamento não foi excessivamente prolongado para evitar mortes de animais tratados e não infectados, o que dificultaria a interpretação dos resultados (Djurkovic-Djakovic & Milenkovic, 2001).

Os resultados referentes ao número de cistos utilizados para o estabelecimento de infecção crônica obtidos no presente estudo concordam com os de Grujić et al. (2005), pesquisadores que tiveram êxito no estabelecimento da infecção crônica utilizando 20 cistos da mesma cepa de *Toxoplasma gondii*. Estão de acordo também com os dados encontrados por Djurkovic-Djakovic & Milenkovic (2001) que discutiram a inviabilidade de estabelecer a infecção crônica com uso de um número superior a 20 cistos. E seguem o mesmo padrão observado por Fux et al.(2003) e também por Suzuki et al.(1993), diferenciando-se apenas a via de inoculação que, no caso desses autores, foi realizada intraperitonealmente.

O estudo sorológico destes animais não detectou títulos de IgM, fato explicado pelo tempo da infecção, pois esta classe de imunoglobulinas sofre acentuada queda poucas semanas após sua produção (Handman & Remington, 1980). Títulos de IgG foram encontrados, confirmando a infecção crônica, entretanto estes não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos com animais infectados.

Não houve alterações significativas nos títulos de IgG dos animais submetidos ao tratamento imunossupressor quando comparados ao grupo controle, entretanto estes últimos apresentaram uma tendência a títulos maiores, o que, indiretamente, pode mostrar a eficácia da imunossupressão (Kang et al., 2006).

O fato de não serem encontrados títulos de IgM a princípio descartaria uma possível reativação da infecção, entretanto deve-se considerar que a administração da terapia imunossupressora pode inibir a divisão de linfócitos B, alterando a produção desta imunoglobulina. Na literatura científica, alguns autores têm discutido sobre a baixa confiabilidade dos resultados de títulos de IgM para identificação de infecção ativa por *Toxoplasma gondii* em indivíduos imunossuprimidos (Pinon et al.,1995; Ferreira, 2000).

A avaliação clínica dos camundongos demonstrou o surgimento de sintomas como alopecia, diarreia, dor ao manuseio, diminuição do apetite e letargia em 62,5% dos animais tratados com a combinação dos três medicamentos imunossupressores, sugerindo a reativação da infecção crônica. Esta sintomatologia é sugestiva de infecção aguda por *Toxoplasma gondii*, como foi demonstrado em coelhos por Hazioglu et al. (2003) e em seres humanos por Mies (1998).

Contrariamente aos resultados clínicos, o estudo histopatológico não evidenciou lesões sugestivas de reativação de toxoplasmose crônica nos órgãos analisados, mesmo naqueles animais que apresentaram sintomas na

avaliação clínica. É provável que o modelo escolhido tenha contribuído para estes resultados. A utilização de uma linhagem de camundongo resistente ao *T. gondii* e um regime imunossupressor de menor duração podem ter possibilitado o surgimento de sintomas clínicos antes que a reativação pudesse ser detectada por técnica histopatológica. Essa hipótese é reforçada pelos resultados obtidos por Djurkovic-Djakovic & Milenkovic (2001) que identificaram este tipo de lesão utilizando modelo experimental substancialmente diferente com camundongos Swiss-Webster. Esta linhagem é, reconhecidamente, muito susceptível à infecção toxoplásmica (Djurkovic'-Djakovic' et al., 2006) em extenso regime de tratamento que, no caso, chegou a sete semanas.

Aparentemente os efeitos de regimes imunossupressores sobre a infecção toxoplásmica sofrem grande influência do modelo murino proposto. A variação no tipo de cepa de *Toxoplasma gondii* utilizada, o estágio do parasito e a via de inoculação, a espécie e linhagem do animal experimental, o tipo de medicamento, sua quantidade e duração do tratamento parecem ser variáveis importantíssimas para o curso da infecção. Takashima et al. (2008) sugerem a seleção de linhagens mais resistentes de camundongos e mesmo o uso de outras espécies animais (por exemplo, ratos) como o melhor modelo experimental para a infecção toxoplásmica humana.

A reativação da toxoplasmose crônica é uma das maiores causas de óbito em indivíduos imunossuprimidos, entretanto a dinâmica deste processo é ainda pouco conhecida. Conclui-se, no presente estudo, que, embora os resultados sorológicos e histopatológicos não tenham evidenciado alterações, os dados clínicos foram suficientemente significativos para indicar a reativação da toxoplasmose.

REFERÊNCIAS

1. Anthuber M, Sudhoff F, Schuetz A, Kenkes BM. Donor transmitted infections in heart transplantation – HIV, CMV and toxoplasmosis. *Transplant Proc* 23: 2634–2635, 1991.
2. Bernsteen L, Gregory CR, Aronson LR, Lirtzman RA, Brummer DG. Acute toxoplasmosis following renal transplantation in three cats and a dog. *J A Vet Med Ass* 215: 1123-1126, 1999.
3. Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW & Ávila, SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
4. Da silva AV, Cutolo AA, Langoni A. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-toxoplasma em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. *Arq Inst Biol* 69: 7-11, 2002.
5. Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJF, Larivière M. Toxoplasmosis in bone marrow transplant recipients: report of seven cases and review. *Clin Infect Dis* 15: 267–270, 1992.
6. Devada K, Anandan R, Dubey JP. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras, Índia. *J Parasitol* 84: 621-622, 1998.
7. Djurkovic-Djakovic O, Milenkovic V. Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. *Acta protozool* 40: 99–106, 2001.
8. Djurkovic-Djakovic O, Klun I, Khan A, Nikolic A, Knezevic-usaj S, Bobic B, Sibley LD. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect* 8: 2206-2212, 2006.

9. Dubey, JP. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J Parasitol* 84: 862-865, 1998.
10. Dubey JP. Toxoplasmosis- a waterborne zoonosis. *Vet parasitol* 126: 57-72, 2004.
11. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press. Florida, 1988.
12. Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 159-162, 2000
13. Fux B, Rodrigues CV, Portela RW, Silva NM, Su C, Sibley D, Vitor RWA, Gazzinelli, RT. Role of Cytokines and Major Histocompatibility Complex Restriction in Mouse Resistance to Infection with a Natural Recombinant Strain (Type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect immun* 71: 6392-6401, 2003.
14. Grujić J, Djurković-Djaković O, Nikolić A, Klun I, Bobić B. Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. *Int J of Antimicrob Agents* 25: 226-230, 2005.
15. Handman E, Remington JS. Antibody responses to *Toxoplasma* Antigens in Mice Infected with Strains of Different Virulence. *Infect Immun* 29: 215-220, 1980.
16. Haziroglu R, Altintas K, Atasever A, Gulbahar MY, Tunca OKR 2003. Pathological and Immunohistochemical Studies in Rabbits Experimentally Infected with *Toxoplasma gondii*. *Turk J Vet Anim Sci* 27: 285-293, 2003.
17. Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35: 1411-1414, 1997.
18. Kang K, Choi I, Shin D, Lee Y. Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamethasone. *Korean J Parasitol* 44: 209-219, 2006.
19. Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. Parasitologia Humana, Atheneu, São Paulo, 2003.
20. Kusne S, Dummer JS, Ho M, Whiteside T, Rabin BS, Makowka L, Esquivel CO, Starzl TE. Self limited *Toxoplasma* parasitemia after liver transplantation. *Transplantation* 44: 457-458, 1986.
21. Mies S. Transplante de fígado. *Rev. Assoc. Med. Bras* 44: 127-134, 1998.
22. Pinon JM, Foudrinier F, Mougeot G, Marx C, Aubert D, Toupance O, Niel G, Danis M, Ynck PC, Remy G, Frottier J, Jolly D, Bessieres MH, Lenoble DR, Bonhomme. Evaluation of Risk and Diagnostic Value of Quantitative Assays for Anti-*Toxoplasma gondii* Immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and Analytical Study of Specific IgG in Immunodeficient Patients. *J Clin Microbiol* 33: 878-884, 1995.
23. Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med* 327: 1643-48, 1992.
24. Renoult E, Chabot F, Aymard B, Hestin D, Delorme N, Biava MF, Kures L, Kessler M. Generalized toxoplasmosis in two renal transplant recipients which received a kidney from the same donor. *Rev Infect Dis* 13: 180-181, 1991.
25. Sumyuen MH, Garin YJ, Derouin F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol Res* 82: 681-686, 1996.
26. Suzuki Y, Orellana MA, Wong SY, Conley FK, Remington JS. Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. *Infect Immun* 61: 2284-2288, 1993.
27. Takashima Y, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Unno A, Kitoh K. Detection of the initial site of *Toxoplasma gondii* reactivation in brain tissue. *Int J Parasitol* 38: 601-607, 2008.
28. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258, 2000.