

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ação dos fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico em placentas de
Calomys callosus (Rodentia: Cricetidae) experimentalmente infectadas com
Toxoplasma gondii.**

Mariana Bodini Angeloni

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Setembro - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ação dos fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico em placentas de
Calomys callosus (Rodentia: Cricetidae) experimentalmente infectadas com
Toxoplasma gondii.**

Mariana Bodini Angeloni

Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Setembro - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ação dos fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico em placentas de
Calomys callosus (Rodentia: Cricetidae) experimentalmente infectadas com
Toxoplasma gondii.**

Mariana Bodini Angeloni

Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro
ICBIM

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em / /

Cecília Lomônaco de Paula

Uberlândia - MG
Setembro - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ação dos fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico em placentas de
Calomys callosus (Rodentia: Cricetidae) experimentalmente infectadas com
Toxoplasma gondii.**

Mariana Bodini Angeloni

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota:

Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 29 de setembro de 2006

Aos meus pais, Edson e Silvia:

Dedico esse trabalho a vocês!

Muito obrigada pelo amor, carinho, paciência, apoio, dedicação, compreensão e companheirismo concedidos a mim durante toda minha vida.

Obrigada por todas as concessões e esforços que fizeram para que eu chegasse até aqui. Vocês sempre foram, e são, pais excepcionais.

Amo muito vocês!

Ao meu irmão, Edson:

Pelo amor, companheirismo, paciência e apoio. Obrigada por não ser apenas meu irmão, mas também, meu melhor amigo!

Te amo!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profª. Drª. Eloisa Amália Vieira Ferro,

Por ter me orientado nesse trabalho, pela dedicação, competência e apoio. Obrigada também pelos conselhos, amizade, companheirismo, apoio e carinho.

Nossa convivência durante esses anos me fez aprender e crescer muito, tanto profissional quanto pessoalmente. Sem você, essa etapa da minha vida não teria se concretizado. Muito obrigada por tudo!

Tenho um carinho muito especial por você!

Agradeço:

À Deus e à Nossa Senhora Desatadora dos Nós.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo pela orientação durante a ausência da Eloisa, pelas idéias e sugestões durante a execução desse trabalho. Muito obrigada pelo apoio e atenção.

À Prof^a. Dr^a. Gabriela Lícia Santos Ferreira, pela fundamental e importante ajuda na realização deste trabalho, mas principalmente pela amizade, carinho, incentivo e apoio. Gabi, muito obrigada por tudo.

À Prof^a. Deise Aparecida Oliveira Silva, pela ajuda no teste ELISA e com as análises estatísticas. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Beletti, pelo auxílio na captura de imagens e na mensuração da carga parasitária.

Aos técnicos, Rui, Thiago e Richard, pelo auxílio no processamento do material para microscopia ótica, na confecção das lâminas e pela amizade durante esse período.

Ao técnico, Héliog Heinish Werneck, pelo grande auxílio prestado no laboratório (micrótomo de historesina, corantes, fotografia e navalhas). Obrigada por ter me ajudado sempre que precisei.

À secretária, Juscélia, pelo carinho e apoio.

À Lorena, pela convivência que muito me fez aprender e crescer. Obrigada por tudo.

À Idessânia, à Bellisa e à Angélica, pelo auxílio antes e durante a execução desse trabalho. Obrigada também pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos Azul e Isabel, pela amizade, companheirismo, apoio, cumplicidade e momentos muito felizes. Amo vocês.

Às minhas amigas Fernanda e Márcia, pela amizade e momentos de alegria, mas principalmente por terem ficado ao meu lado no momento em que mais precisei. Muito obrigada pelo companheirismo e apoio, amo vocês.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório com ampla distribuição mundial. Há duas situações em que a toxoplasmose é potencialmente grave: em pacientes imunodeprimidos e quando adquirida de forma congênita. Utilizando a associação de fármacos sulfadizina, pirimetamina e ácido folínico, objetivou-se verificar a eficiência do tratamento em tecidos placentários de *Calomys callosus*. Animais com 14 dias de gestação e inóculo de 20 cistos da cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*, foram tratados com a associação de fármacos e sacrificados do 17º ao 20º dia de gestação/inóculo. Tecidos placentários foram processados para análise morfológica e imunohistoquímica. A eficácia do tratamento foi avaliada através do teste não-paramétrico Mann Whitney, com nível de significância de $P < 0,05$. A carga parasitária nos tecidos placentários de fêmeas que não receberam tratamento foi significativamente maior quando comparada com animais tratados com a associação ($P < 0,05$). Os fármacos mostraram-se eficazes, pois diminuíram a carga parasitária indicando que a transmissão vertical da toxoplasmose pode ser diminuída em decorrência do tratamento, sugerindo que *C. callosus* é um bom modelo experimental para estudos relacionados à eficácia do tratamento da toxoplasmose congênita.

Palavras - Chave: *Calomys callosus*, toxoplasmose congênita, tratamento.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. <i>TOXOPLASMA gONDII</i> | 1 |
| 1.2. FORMAS INFECTANTES | 3 |
| 1.3. CICLO DE VIDA | 5 |
| 1.4. CEPAS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> | 7 |
| 1.5. TOXOPLASMOSE | 8 |
| 1.6. TOXOPLASMOSE EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS | 9 |
| 1.7. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA | 10 |
| 1.8. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE | 12 |
| 1.9. TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE | 14 |
| 1.10. TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA | 16 |
| 1.11. PLACENTA | 22 |
| 1.12. MODELO EXPERIMENTAL <i>CALOMYS CALLOSUS</i> | 23 |
| 1.13. PLACENTA DE <i>C. CALLOSUS</i> | 24 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| 2.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO | 26 |
| 2.2. CEPA ME49 DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> | 26 |
| 2.3. ACASALAMENTO | 26 |
| 2.4. INFECÇÃO POR <i>TOXOPLASMA GONDII</i> E TRATAMENTO DOS ANIMAIS INFECTADOS | 27 |
| 2.5. SACRIFÍCIO DAS FÊMEAS E COLETA DO MATERIAL | 28 |
| 2.6. PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA EM MICROSCOPIA DE LUZ | 28 |
| 2.7. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA DE LUZ | 29 |
| 2.8. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A DETECÇÃO DE TAQUIZOÍTAS | 29 |
| 2.9. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE BRADIZOÍTAS | 30 |
| 2.10. TESTE ELISA | 30 |
| 2.11. ANÁLISE QUANTITATIVA DE PARASITOS | 31 |
| 2.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 3. RESULTADOS | 33 |
| 3.1. TESTE ELISA | 33 |
| 3.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA AO MICROSCÓPIO DE LUZ..... | 33 |
| 3.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA..... | 34 |
| 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 35 |
| 4. DISCUSSÃO | 37 |
| 4.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA PLACENTA DE <i>C. CALLOSUS</i> | 37 |
| 4.2. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA PLACENTA DE <i>C. CALLOSUS</i> | 38 |
| 5. CONCLUSÕES | 41 |
| 6. FIGURAS E GRÁFICOS | 42 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii foi descrito no mesmo ano em dois países diferentes. Splendore (1908) descreveu a espécie em coelhos no Instituto Biológico de São Paulo, no Brasil. Nicolle & Manceux (1908) descreveu *T. gondii* no roedor africano *Ctenodactylus gundi*, no Instituto Pasteur, na Tunísia (NEVES, 2002).

Toxoplasma gondii pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, sub-classe Coccidia, ordem Eucoccidia, sub-ordem Eimeriina, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma* (REY, 2001). É um protozoário cosmopolita, parasito intracelular obrigatório e capaz de infectar um amplo espectro de hospedeiros, que incluem todos os animais de sangue quente e alguns invertebrados (NEVES, 2002).

Quanto à sua morfologia, *T. gondii* possui estrutura alongada com forma de curva ou em crescente, podendo também ser visualizado em formato oval, indicando início do processo de divisão celular (REY, 2001). Há presença de um núcleo, situado no meio do corpo ou mais próximo da extremidade posterior, todas as organelas de células de eucariontes, além de outras típicas do parasito. Possui uma membrana externa simples e uma membrana interna dupla, formada pelo acoplamento de duas membranas unitárias. A membrana externa é contínua, enquanto que a interna é fenestrada e incompleta, principalmente no pólo anterior do parasito (DUBEY et al. 1998; REY, 2001).

Na região anterior do parasito localiza-se o aparelho apical que consiste em uma prega na membrana plasmática que delimita uma depressão central. O conóide, que se situa abaixo desta depressão, é uma organela em forma de cone oco e é composto por três anéis de microtúbulos. Dos três anéis, dois são encontrados na própria região apical e um deles, que se localiza mais posteriormente, é conhecido como anel polar. Entre o anel apical inferior e o anel polar há de seis a oito microtúbulos que se cruzam obliquamente. Além disso, partem do anel polar vinte e dois microtúbulos, que se dispõem espiralmente sob o complexo da membrana interna e vão até a região posterior do parasito (FERRO, 2000; REY, 2001).

No interior do conóide encontram-se as roptrias e micronemas, que são organelas secretoras. A proteólise induzida por essas organelas está intimamente associada à invasão de *T. gondii* à célula hospedeira (CARRUTHERS, 2006).

As roptrias estão associadas à invasão propriamente dita, ou seja, elas atuam na internalização do taquizoíta no vacúolo parasitóforo. Isso é feito através da liberação de enzimas proteolíticas, como a ROP-1 ou PEF (fator de incremento de penetração) (FERRO, 2000; NEVES, 2002). Além disso, as roptrias liberam seu conteúdo no citoplasma da célula hospedeira e as proteínas (ROP) liberadas atuam na formação do vacúolo parasitóforo e ficam associadas a ele mimetizando uma possível organela da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002). A primeira proteína liberada pelas roptrias a ser identificada foi a ROP-2, que é uma proteína transmembrânica do vacúolo parasitóforo que circunda o parasito e fica exposta no citoplasma da célula hospedeira. A ROP2 possui uma função importante, já que, é ela quem faz a associação da mitocôndria da célula hospedeira ao vacúolo parasitóforo (HAJJ et al., 2006).

As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas e localizam-se na região apical do parasito, abaixo do complexo da membrana interna. Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfície da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; NEVES, 2002). Algumas proteínas presentes nas micronemas já foram descritas, dentre elas estão as MIC-1, MIC-4 e MIC-6, que possuem propriedades de adesão celular. A MIC-2, que está presente em todos os estágios invasivos do parasito, possui um papel importante no reconhecimento da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004).

Além destas organelas, pode-se observar também no citoplasma de *T. gondii* estruturas envoltas por membranas e de conteúdo elétron-denso. Essas estruturas são chamadas de grânulos densos e contêm uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares. Uma das funções dos grânulos densos é a liberação das glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, impedindo a fusão dos lisossomos ao vacúolo, permitindo a manutenção do parasito no hospedeiro. Além disso, esses grânulos promovem a obtenção de nutrientes do hospedeiro (CARRUTHERS, 2002; FERRO, 2000).

Toxoplasma gondii, assim como os outros parasitos do filo Apicomplexa, invade a célula alvo através de mecanismos dinâmicos, diferentemente da forma de invasão de outros microorganismos intracelulares. A maioria dos vírus e das bactérias intracelulares requer a participação da célula hospedeira, a qual engolfa os microorganismos que invadem o hospedeiro

via endocitose ou fagocitose. Ao contrário, *T. gondii* penetra ativamente na célula hospedeira em um processo dependente de actina e miosina do parasito (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004).

O processo de invasão leva de 10 a 20 segundos e inicia-se com o reconhecimento do parasito à célula alvo. Em seguida, há adesão de *T. gondii* à célula através das proteínas adesivas secretadas pelas micronemas. Após a adesão há liberação, pelas roptrias, de enzimas proteolíticas que auxiliam o parasito a invadir a célula hospedeira (CARRUTHERS, 2006; SIBLEY, 2004).

A penetração celular de *T. gondii* se dá através de um processo de motilidade denominado “gliding”, que consiste de movimentos espiralares do parasito. Esse processo é dirigido pelo sistema actina-miosina, que conecta a membrana interna dupla do parasito a proteínas adesivas transmembrânicas secretadas pelas micronemas (CARRUTHERS, 2006).

O mecanismo de invasão finaliza-se com a secreção de antígenos pelo protozoário e modificações estruturais na membrana do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS, 2002).

1.2. Formas infectantes

Toxoplasma gondii possui três formas infectantes: a) taquizoítas (presentes em grupos ou clones); bradizoítas (presentes em cistos teciduais); c) esporozoítos (encontrados em oocistos) (DUBEY et al., 1998).

- **Taquizoítas (*Tachis* = rápido)**

Frenkel (1973) foi o primeiro a descrever essa forma, a primeira de *T. gondii* a ser descrita. Os taquizoítas apresentam-se na forma oval ou crescente, possuem uma das extremidades mais afilada e a outra arredondada. Os taquizoítas medem cerca de 2 – 4 µm de largura e 4 – 8 µm de comprimento e apresentam um núcleo em posição central (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; NEVES, 2002).

Ultra estruturalmente taquizoítas apresentam várias organelas, tais como: anéis apicais e polares, roptrias, micronemas, conóide, mitocôndrias, complexo de Golgi, ribossomos, entre outras (DUBEY et al., 1998). Além disso, expressam genes estágios-específicos como SAG-1 e LDH1 (EATON et al., 2006).

Taquizoíta é uma forma móvel e de multiplicação rápida, pelo processo de endodiogenia (NEVES, 2002). Desta forma, os taquizoítas constituem a forma invasiva de *T. gondii*,

responsável pelas manifestações da infecção aguda. Nesta fase da infecção ocorre parasitemia, podendo causar as manifestações clínicas da toxoplasmose. Na fase aguda da doença é possível encontrar taquizoítas no sangue, linfa, exsudatos e secreções, bem como em diversos tipos celulares do organismo do homem e de animais (FARHAT et al., 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Os taquizoítas são pouco resistentes à ação do suco gástrico (NEVES, 2002). Além disso, eles são muito estudados em relação à ação de medicamentos, já que são muito vulneráveis aos fatores de defesa produzidos pelo sistema imunológico (PEREIRA, 1998).

Através de mecanismos imunológicos do hospedeiro há formação de cistos teciduais e há transformação de taquizoítas em bradizoítas (MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

- **Bradizoítas (Brady = lento)**

Os bradizoítas são morfológicamente idênticos aos taquizoítas, porém, possuem multiplicação lenta e expressam algumas moléculas estágio – específicas, como BAG-1, CST-I e LDH2. Os bradizoítas ficam protegidos pelo cisto e por isso são mais resistentes à pepsina, tripsina e ao sistema imunológico. Além disso, os bradizoítas possuem vacúolos citoplasmáticos que provavelmente armazenam carboidrato (amilopectina), que é importante na fase de latência. O núcleo dos bradizoítas é situado na região posterior, diferentemente dos taquizoítas que possuem núcleo na região central. (DUBEY, 2004; EATON et al., 2006; MCLEOD et al., 1991; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Essa forma de *T. gondii* é encontrada no interior de cistos que são formados nos tecidos do hospedeiro. Esses cistos possuem tamanho variado, que vai de 5 a 70 μm e podem conter de centenas a milhares de bradizoítas em seu interior (DUBEY, 2004). Além disso, os cistos teciduais são geralmente encontrados na fase crônica da toxoplasmose também chamada de período de latência da infecção (NEVES, 2002).

Os cistos podem permanecer nos tecidos por toda a vida do hospedeiro. Caso haja uma imunossupressão, os bradizoítas voltam a se multiplicar rapidamente, são liberados e há disseminação do parasito no organismo sob a forma de taquizoítas (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

- **Oocistos**

Os oocistos são esféricos, medem cerca de 10 x 12 µm e possuem uma parede dupla muito resistente ao meio. A liberação desses oocistos, pelas fezes dos felídeos, ocorre em um período de 7 a 21 dias, após a ingestão de parasitos, e quando liberados estão imaturos. Após a esporulação, que ocorre no meio ambiente em cerca de 1 – 5 dias após serem liberados, os oocistos passam a conter em seu interior dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada, tornando-se infectantes (DUBEY, 2004; NEVES, 2002).

Oocistos podem permanecer infectantes por mais de um ano após a esporulação, se estiverem em ambiente adequado, ou seja, locais úmidos e com altas temperaturas, em torno de 37°C (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Infecções em mamíferos aquáticos indicam que os oocistos são capazes de sobreviver também em águas marinhas (HILL; DUBEY, 2002).

1.3. Ciclo de vida

O ciclo biológico de *T. gondii* se processa em duas fases distintas: a fase assexuada e a sexuada. Os felídeos dos gêneros *Felis* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos porque apresentam a fase coccidiana do ciclo, na qual ocorre uma etapa assexuada (merogonia) e uma sexuada (gamogonia). Já os outros animais, como mamíferos e aves, possuem apenas o ciclo assexuado do parasito e são considerados hospedeiros intermediários de *T. gondii* (DUBEY, 2004; DUBEY et al., 1998; NEVES, 2002).

Os felídeos podem se contaminar ao ingerir cistos teciduais contendo bradizoítas, oocistos maduros ou taquizoítas, dando início à fase enteroepitelial do ciclo, que ocorre em células epiteliais do intestino delgado desses animais (NEVES, 2002). Esses são os únicos animais capazes de eliminar oocisto de *T. gondii* nas fezes. Essa eliminação ocorre de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos teciduais, 18 dias após ingestão de oocistos e 13 dias após ingestão de taquizoítas. Quando há ingestão de taquizoítas ou oocistos cerca de 30% dos gatos passam a eliminar oocistos, no entanto, aproximadamente 100% dos gatos passam a eliminar oocistos após ingerirem cistos teciduais (DUBEY et al., 1998).

O ciclo induzido pela ingestão de bradizoítas é o mais conhecido em detalhes. Após a ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, inicia-se a fase coccidiana do ciclo. A parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago desses animais, promovendo a liberação de bradizoítas que penetram nas células do estômago e do intestino. Nas células epiteliais do

intestino, há o início da etapa assexuada do ciclo, na qual os parasitos começam a se multiplicar através do processo de endodiogenia (merogonia). Há então a formação de merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo, esse conjunto recebe o nome de esquizonte maduro (DUBEY, 2004; DUBEY et al., 1998).

A etapa sexuada do ciclo coccidiano se inicia quando ocorre o rompimento da célula infectada com conseqüente liberação dos merozoítos. Estes penetram em outras células epiteliais e se transformam em formas sexuadas masculinas e femininas, que após a maturação formam os gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis (microgametas). Os microgametas saem das células e fecundam o macrogameta, presente em outras células. Depois da fertilização há formação de uma parede externa envolta do zigoto, dando origem ao oocisto imaturo que é liberado para o meio junto com as fezes dos felídeos (DUBEY, 2004; NEVES, 2002).

A maturação do oocisto ocorre no meio externo em um período de 1 a 5 dias após a eliminação. Essa maturação ocorre através de um processo denominado esporogonia, que dá origem a esporozoítos no interior dos oocistos, tornando-os infectantes aos hospedeiros (NEVES, 2002; REY, 2001).

Os hospedeiros definitivos, como o homem, por exemplo, podem adquirir a infecção por diferentes maneiras. Através da ingestão de oocistos, que presentes no solo podem contaminar água e alimentos; ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal passadas; ingestão de taquizoítas que podem estar presentes em líquidos biológicos (saliva, leite, esperma); transplantes de órgãos e infecções transplacentárias (FERREIRA; AVILA, 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Uma vez que o hospedeiro intermediário entra em contato com uma das formas infectantes de *T. gondii*, o parasito sofre intensa multiplicação e penetra em vários tipos celulares do organismo hospedeiro, local onde o parasito forma o vacúolo parasitóforo e se multiplica por endodiogenia formando novos taquizoítas. Estes rompem as células parasitadas e infectam outras células, essa fase proliferativa de taquizoítas é chamada de fase aguda da toxoplasmose. Através de mecanismos imunológicos do hospedeiro, ocorre diminuição da quantidade de parasitos circulantes no organismo e alguns taquizoítas evoluem para bradizoítas com a formação de cistos, essa é a fase crônica da doença. Se não houver nenhum distúrbio no sistema imunológico essa

fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; NEVES, 2002).

1.4. Cepas de *Toxoplasma gondii*

As cepas podem ser de linhagem virulenta ou avirulenta. Quando virulentas, a multiplicação extracelular de taquizoítas ocorre em ritmo acelerado e a produção de cistos é lenta. Já no caso de cepas avirulentas, os taquizoítas se multiplicam lentamente e a formação de cistos teciduais é mais rápida (REY, 2001). A virulência das cepas é um dos fatores que determinam o caráter patogênico das mesmas (SUZUKI et al., 1989).

Estudos recentes demonstraram que algumas variabilidades nas manifestações clínicas da infecção por *T. gondii*, estão associadas ao tipo de cepa (VILLENA et al., 2004).

Já foram descritas duas classes clonais de cepas, as recombinantes, que possuem o genótipo identificado, e as exóticas, que são cepas cujos genótipos diferem das recombinantes (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; VILLENA et al., 2004).

Na classe clonal das cepas recombinantes há, descritas, três linhagens clonais, tipos I, II e III. As cepas de tipo I (RH, CAST e VEL) são virulentas em camundongos causando até a morte dos animais e estão associadas, em humanos, a manifestações clínicas graves da toxoplasmose (AJZENBERG et al., 2005; BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

As cepas de linhagens tipo II (ME49, PDS e PLK) e tipo III (CEP e VEG) são avirulentas em camundongos. Em seres humanos, a cepa de tipo II predomina em infecções congênicas e em pacientes com AIDS (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

O sistema imunológico, de pessoas imunocompetentes, promove a defesa contra cepas dos tipos II e III, porém, ele não é capaz de controlar a disseminação de parasitos de cepas do tipo I e exóticas. Isso influencia na virulência das cepas e na patogenia da infecção (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

Estudos demonstraram que o inóculo de apenas um taquizoíta da cepa RH (tipo I) é suficiente para gerar alta carga parasitária e altos níveis de citocinas Th1, que aumentam a apoptose e danos aos órgãos do hospedeiro. Enquanto que, são necessários sucessivos inóculos com elevadas cargas parasitárias, de cepa do tipo II, para se observar a mesma reação (SAEIJ et al., 2005).

Cepas exóticas ou atípicas são freqüentemente observadas em países como a África e o Brasil, devido a grande diversidade de hospedeiros intermediários e definitivos de *T. gondii* (AJZENBERG et al., 2005).

1.5. Toxoplasmose

A toxoplasmose é a zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Essa protozoose, ao contrário de outras doenças causadas por outros parasitos, não é restrita as regiões tropicais e subtropicais. A toxoplasmose possui ampla distribuição geográfica e estima-se que aproximadamente 25% da população mundial apresenta-se infectada por *T. gondii* (FERREIRA et al., 2004; SPALDING et al., 2003).

Os altos índices de infecção da população fazem com que a doença seja uma ameaça à saúde humana. Nos Estados Unidos, por exemplo, a toxoplasmose é considerada a terceira maior causa de morte por contaminação alimentar (CARRUTHERS, 2002). No Brasil, pesquisas sorológicas revelam que 40 – 80% da população é positiva para *T. gondii* (NEVES, 2002). Em algumas áreas brasileiras, aproximadamente 60% das crianças, entre 6-8 anos, possuem anticorpos contra o parasito (HILL; DUBEY, 2002).

A prevalência de pessoas infectadas com a doença está relacionada com diversos fatores que variam de uma região para outra. Dentre os fatores estão, as condições ambientais, o desenvolvimento da região e os hábitos higiênicos e alimentares da população (DUBEY; BEATTIE, 1988; REMINGTON; KLEIN, 2001). Na França, por exemplo, a prevalência de pessoas positivas para *T. gondii* é alta, cerca de 80%, já que os franceses possuem o hábito de comer carne mal cozida (REMINGTON; KLEIN, 2001). Nos países tropicais a prevalência da infecção também é alta, já que o clima nesses lugares favorece a esporulação e a sobrevivência dos oocistos (JONES et al., 2001).

A infecção possui dois estágios: fase aguda e fase crônica. Na fase aguda há predomínio de taquizoítas, que através, principalmente de monócitos, disseminam-se pelo sangue do hospedeiro, até que haja o desenvolvimento da resposta imunológica, o que ocorre após 7 – 10 dias de infecção (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). É nessa fase que podem ocorrer algumas manifestações clínicas, como a febre e a linfadenopatia. Porém na maioria dos casos, cerca de 85 – 90%, a doença se processa de forma assintomática (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A fase crônica estabelece-se após haver resposta imunológica, humoral e celular, contra o patógeno. Entretanto o sistema imunológico não elimina completamente a infecção, permanecendo cistos teciduais, que podem permanecer por toda a vida do hospedeiro (DUBEY, 2004; FERREIRA; ÁVILA, 2001).

As manifestações clínicas e a severidade da infecção dependem da interação entre o parasito e o hospedeiro e incluem, a virulência da cepa, o tamanho do inóculo, a rota de infecção, a capacidade de resposta imune (humoral e celular) do hospedeiro, a integridade das mucosas e das barreiras epiteliais do hospedeiro, a idade e o background genético do hospedeiro (RORMAN et al., 2005).

Em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose geralmente cursa de forma benigna. Mas há dois casos em que a doença é potencialmente grave: em pacientes imunocomprometidos e quando há transmissão congênita da doença (GROSS et al., 2004).

1.6. Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos

Diferentemente do que ocorre em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos cursa de forma grave e pode ser uma ameaça à vida (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). O comprometimento do sistema imune pode ser causado por tratamento com drogas imunossupressoras, transplantes de órgãos e doenças que afetam o sistema imunológico, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Os mais severos efeitos patológicos causados por *T. gondii* ocorrem quando o sistema imunológico do hospedeiro é afetado e o parasito re-emerge de um estado latente. Quando há disfunção do sistema imune, os mecanismos de defesa do organismo ficam prejudicados, dessa forma os bradizoítas passam a se replicar rapidamente e assumem a forma de taquizoítas, que ganham a circulação sanguínea e invadem órgãos e tecidos (CARRUTHERS, 2002; FERREIRA; ÁVILA, 2001).

A reativação da doença pode ocorrer em vários tecidos, mas o de maior importância clínica é o sistema nervoso central, onde a replicação descontrolada do parasito causa encefalites toxoplásmicas. A reativação da toxoplasmose é particularmente séria em pacientes que passaram por transplante de medula óssea, o índice de mortalidade nesses casos é freqüentemente maior que 90% (CARRUTHERS, 2002).

No caso de transplante de órgãos, a infecção está associada a duas diferentes situações. A doença pode ser transmitida durante o transplante, quando o doador é positivo e o receptor negativo. Ou pode ainda ser causada por reativação, em pacientes em fase crônica da infecção, devido à terapia imunossupressora que é indicada a pacientes transplantados (HILL; DUBEY, 2002).

Nas duas últimas décadas, a toxoplasmose emergiu como a maior e mais comum infecção oportunista associada à AIDS (CARRUTHERS, 2002). Estima-se que 10% dos pacientes com AIDS, nos Estados Unidos, e 30% na Europa, morreram devido à toxoplasmose (HILL; DUBEY, 2002). O sinal clínico mais comum nesses casos é a encefalite toxoplásmica, que causa calcificações intracranianas. O quadro de pneumonite também é frequentemente observado nesses casos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; PASSOS et al., 2000).

Outras manifestações clínicas observadas em pacientes imunocomprometidos com toxoplasmose são deficiências motoras e mentais, retardamento mental e toxoplasmose pulmonar que causa insuficiências respiratórias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.7. Toxoplasmose congênita

A transmissão congênita da toxoplasmose ocorre quando a mulher adquire a infecção durante o período gestacional (JONES et al., 2001). A toxoplasmose congênita é grave e pode causar sérios danos ao feto quando infectado. A incidência da infecção congênita varia entre os países, estima-se mundialmente que de cada 1000 nascimentos de 3 - 8 bebês são infectados intra-uterinamente (RORMAN et al., 2005). Estudos demonstraram que nos Estados Unidos, país considerado com baixa incidência de toxoplasmose congênita, a doença afeta de 500 a 5000 recém nascidos a cada ano (BOYER et al., 2005).

A prevalência de mulheres, em idade gestacional, soro-positivas para *T. gondii* é de 15% nos Estados Unidos, de 58% na Europa Central, de 51 - 72% na América Latina e de 54 - 77% em países africanos (RORMAN et al., 2005).

Mulheres infectadas cronicamente, quando imunodeprimidas, também podem transmitir o parasito ao feto, resultando em toxoplasmose congênita. Nesse caso, com a supressão do sistema imune, há reativação da doença e posterior infecção placentária e fetal (CHEN et al., 2005). Bachmeyer e colaboradores (2006) notificaram um caso de transmissão congênita da

toxoplasmose em consequência de reativação da infecção, em uma mulher que não estava severamente imunodeprimida.

Na toxoplasmose congênita, o parasito, que se encontra na forma de taquizoíta, ganha a circulação fetal após haver a infecção da placenta (BACHMEYER et al., 2006). Ao entrar em contato com o parasito, o feto pode apresentar infecção com diferentes graus de severidade dependendo da virulência da cepa de *T. gondii*, da capacidade de resposta imune materna durante a parasitemia e do período gestacional (RORMAN et al., 2005; SPALDING et al., 2003). A probabilidade de haver transmissão congênita da toxoplasmose é de 50% (JONES et al., 2003).

A probabilidade de haver infecção fetal quando a primeira infecção materna ocorre no período pré-concepção, é de apenas 1%. Quando a mulher adquire a infecção no primeiro e segundo trimestres de gestação, a chance de ocorrer transmissão da doença para o feto é de 10 - 25%, enquanto que, quando ocorre no terceiro trimestre gestacional, a infecção fetal ocorre com maior frequência, em cerca de 60 - 90% dos casos (JONES et al., 2003; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Entretanto, os danos causados aos fetos, em consequência da infecção por *T. gondii*, são mais graves quando a transmissão da doença se dá no primeiro e segundo trimestres de gestação e mais amenos quando a infecção fetal ocorre no terceiro trimestre gestacional (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

Quando infectados alguns fetos podem apresentar sinais clínicos da toxoplasmose antes do nascimento, como calcificações intracranianas, dilatação ventricular e aumento hepático. Já as manifestações clínicas em neonatos podem variar e incluem: hidrocefalia, microcefalia, coriorretinite, estrabismo, cegueira, retardo psicomotor e mental, trombocitopenia e anemia (MONTOYA; LIESENFELD, 2004). A tríade clássica da toxoplasmose que inclui coriorretinite, calcificação intracraniana e hidrocefalia, é encontrada em menos de 10% dos casos de infecção congênita (RORMAN et al., 2005). A infecção aguda materna também pode levar a morte do feto, causando abortos (CHEN et al., 2005).

As manifestações clínicas da toxoplasmose em recém nascidos podem ser confundidas com infecção por outros agentes, como por exemplo, citomegalovírus, vírus *Herpes simplex*, vírus da rubéola, além de eritroblastose fetal e algumas doenças degenerativas (FARHAT et al., 1998; JONES et al., 2003).

Na maioria dos casos (70 – 90%) os recém nascidos são assintomáticos para a doença e podem desenvolver lesões na segunda ou terceira décadas de vida, sendo que, 80% das crianças que nascem com toxoplasmose congênita desenvolvem problemas de aprendizagem ou visuais na vida adulta (JONES et al., 2003; RORMAN et al., 2005). Estudos realizados por Vutova e colaboradores (2002) demonstraram que a manifestação clínica ocular mais freqüente (92% dos casos) decorrente da toxoplasmose congênita é a coriorretinite (RORMAN et al., 2005).

A educação da população e, principalmente, das mulheres, sobre a doença e sobre as formas de prevenção, diminui significativamente a incidência da toxoplasmose congênita (KRAVETZ; FERDERMAN, 2005).

1.8. Diagnóstico da toxoplasmose

O diagnóstico da toxoplasmose é feito, principalmente, por testes sorológicos. Os testes sorológicos são realizados tendo como objetivo a detecção de anticorpos IgG e IgM, que são muito importantes para a confirmação, ou não, da doença (GROSS et al., 2004).

A detecção de anticorpos pode ser feita através do teste ELISA, que é uma reação imunoenzimática, quantificada através da reação enzima – substrato. A enzima pode ser ligada a um anticorpo específico e pode ser usada para a detecção de antígeno (ELISA indireto), ou ainda, a enzima pode ser utilizada para detectar anticorpo (ELISA direto). Basicamente o teste consiste de uma reação antígeno – anticorpo, na qual utiliza -se um anticorpo marcado com uma enzima, neste caso a peroxidase. O substrato é capaz de produzir uma coloração após sua reação com a enzima ou complexo anticorpo – enzima usada na reação. O produto calorimétrico formado pode ser visualizado e mensurado com o auxílio de um espectrofotômetro – leitor de ELISA (FERREIRA; TEIXEIRA, 2005).

O teste utilizado neste trabalho foi o ELISA indireto que pode ser assim sintetizado. Primeiramente, coloca-se o antígeno na placa, em seguida adiciona-se o soro contendo anticorpos específicos para o antígeno. Após a incubação e lavagens consecutivas, são adicionados os anticorpos anti-imunoglobulinas (IgG ou IgM) marcados com uma enzima (conjugado), estes anticorpos são contra as porções Fc do anticorpo presente no soro. Em seguida, coloca-se o substrato contendo o cromógeno. A reação é considerada positiva quando há mudança de coloração, que é resultado da reação da enzima com o substrato solúvel. Essa mudança de cor é então lida através de um comprimento de onda próprio, utilizando-se um leitor de ELISA, que na

verdade é um espectrofotômetro, capaz de ler uma placa de 96 poços (também chamadas de micropoços) (FERREIRA; TEIXEIRA, 2005).

A detecção de anticorpos IgM indica infecção aguda, já que, os títulos deste anticorpo podem ser detectados sete dias após a infecção, alcançam título máximo em poucas semanas e declinam gradualmente. Já quando há detecção somente do isotipo IgG, a infecção pode estar na fase crônica, estes anticorpos atingem titulação máxima em, cerca de 6 semanas e permanecem com baixos títulos por toda a vida (FERRO, 2000). Entretanto, estudos demonstraram que o anticorpo IgM pode permanecer por mais de 18 meses após a infecção, levando a resultados sorológicos falso positivos (JONES et al., 2003).

Uma das formas de determinação, em pacientes imunocompetentes, de fase aguda ou crônica da infecção é pela realização de testes sorológicos ELISA avidez (SUKTHANA, 2006). Avidez do anticorpo indica a força total da interação entre o anticorpo e o antígeno, ou seja, indica a afinidade funcional do anticorpo pelo antígeno (ROITT, 2003). Anticorpos IgM possuem baixa avidez, o diagnóstico deve ser baseado na avidez de IgG, já que, no início da infecção a avidez deste anticorpo é baixa. À medida que a infecção progride, há maturação da resposta imunológica, e o anticorpo IgG passa a apresentar alta avidez (REMINGTON et al., 2004; SUKTHANA, 2006).

No caso de mulheres grávidas um diagnóstico preciso é extremamente importante, sendo necessária a determinação da fase da infecção em que a mãe se encontra para se avaliar os riscos de transmissão da doença ao feto. Dessa forma, outros testes complementares podem ser realizados para determinar o tempo de infecção materna. Teste de avidez de IgA, IgE e IgG são utilizados para diagnosticar, de forma mais precisa, infecção aguda (SUKTHANA, 2006). Assim, mulheres grávidas devem sempre recorrer a laboratórios de referência no diagnóstico da toxoplasmose (JONES et al., 2003).

Quando diagnosticada a infecção materna aguda, o próximo passo é verificar se o feto também foi infectado. O diagnóstico fetal, através de testes sorológicos, nem sempre é seguro, já que, alguns fetos com toxoplasmose congênita apresentaram-se negativos para anticorpos IgM e IgA. O anticorpo IgG também não é indicador de infecção, uma vez que esses anticorpos são transmitidos, via placenta, da mãe para o feto. Dessa forma, o teste mais utilizado é o PCR que é feito em fluido amniótico, tecidos placentários, sangue, urina e fluido cerebrospinal (REMINGTON et al., 2004).

Para o diagnóstico de pacientes imunocomprometidos, a detecção de anticorpos específicos IgA e/ou IgE são indicadores de reativação da doença, entretanto, não permitem a distinção clara da encefalite toxoplásmica (sintoma característico da toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos) de linfoma. Testes de avidéz de IgG também não auxiliam em casos de reativação da doença. Assim, o diagnóstico, nesses casos, é feito por detecção direta do parasito a partir do fluido cerebrospinal ou por biópsia utilizando PCR (GROSS et al., 2004).

1.9. Tratamento da toxoplasmose

A primeira contribuição importante para o tratamento da toxoplasmose foi dada em 1941 por Sabin e Warren, quando verificaram-se que as sulfonamidas possuíam efeito no tratamento da doença em camundongos. Em 1943, Bioca e Nóbrega determinaram que dentre as sulfonamidas, a sulfadiazina era uma das mais eficientes contra o parasito. Finalmente, em 1952 Summers, Eyles e colaboradores verificaram que a pirimetamina também tinha efeito contra *T. gondii* e que, quando usada em associação com a sulfadiazina, produzia maior número de curas do que as drogas testadas até aquela época (PÊSSOA, 1977).

O tratamento da toxoplasmose é um assunto muito discutido, já que há poucos estudos realizados com seres humanos, sendo que a maioria deles é realizada em animais de laboratório, e há controvérsia quanto à posologia e a duração da terapêutica (REY, 2001).

Outro fator agravante acerca do tratamento da toxoplasmose é que as drogas que são efetivas contra a doença são muito tóxicas, causando diversos efeitos colaterais aos pacientes submetidos ao tratamento. Além disso, os fármacos atuam apenas sobre a forma proliferativa de *T. gondii* (taquizoítas), não sendo úteis para erradicar as formas encistadas do parasito (FARHAT et al., 1998; REY, 2001). Djurkovic-Djakovic e colaboradores (2002) demonstraram que os fármacos atovaquone e clindamicina, quando usados em combinação, são eficazes no tratamento de modelos murino infectados com a cepa cistogênica ME49 de *T. gondii*. Em 2006, Ferreira e colaboradores demonstraram que a droga PHNQ6 quando combinada com a sulfadiazina, é eficaz no tratamento de toxoplasmose crônica em camundongos. Porém não há estudos em seres humanos que demonstrem a eficácia dos fármacos em cistos do parasito.

A toxoplasmose, em pacientes imunocompetentes causa infecções brandas e muitas vezes imperceptíveis, sendo posteriormente controlada pelo sistema imune do hospedeiro. Por isso, não se recomenda tratamento para a doença nesses casos. Há três situações em que o tratamento da

toxoplasmose é indicado: infecção em pacientes imunodeprimidos, pessoas com AIDS, por exemplo, nas quais ocorre a reativação da doença; toxoplasmose ocular; e infecção congênita (JONES et al., 2001; RORMAN, 2005).

No caso de pacientes imunodeprimidos, indica-se um tratamento baseado na combinação dos fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico. Entretanto, cerca de 40 – 50% dos pacientes que são submetidos a esse tratamento, desenvolvem algum efeito colateral e necessitam de mudança das drogas (SUKTHANA, 2006).

No caso de pacientes com intolerância a sulfadiazina, pode haver substituição pela clindamicina, que é eficiente contra *T. gondii* quando administrada em combinação com a pirimetamina (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A clindamicina atua na subunidade 50S dos ribossomos e suprime a síntese protéica e demonstra boa atividade no tratamento de encefalites causadas pela toxoplasmose (GILMAN, 1997).

Estudos recentes demonstraram que o atovaquone, droga que inibe o ciclo respiratório do parasito, também é eficiente no tratamento de encefalites toxoplásmicas, em modelos murinos com reativação da toxoplasmose (DUNAY et al., 2004).

O tratamento da toxoplasmose em pacientes imunodeprimidos deve ser mantido por toda a vida do paciente, para prevenir encefalites toxoplásmicas recorrentes (SUKTHANA, 2006). Todo paciente imunodeprimido, soropositivo para *T. gondii*, deve ser submetido a tratamento, mesmo que os exames neurológicos não indiquem lesões (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A coriorretinite é um sinal clínico comum quando há reativação da toxoplasmose. Essa doença ocular se manifesta por uma severa lesão na retina com intensa reação inflamatória local, e quando diagnosticada deve-se iniciar o tratamento imediatamente. Há nove drogas comercialmente disponíveis para o tratamento da coriorretinite, entre as mais usadas estão a associação de pirimetamina e sulfadiazina e a prednisona, que é um glicocorticoide amplamente utilizado nesses casos. A administração da clindamicina, por no mínimo três semanas, também demonstrou resultados favoráveis no tratamento dessas lesões oculares (GILMAN, 1997; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Outra droga que se mostra eficaz no tratamento da toxoplasmose é a azitromicina, que é um macrolídeo que atua inibindo a síntese protéica do parasito (GILMAN, 1997; MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Braz e colaboradores (1999) demonstraram que a azitromicina possui ação evidente no tratamento da toxoplasmose. Camundongos infectados foram tratados com

azitromicina e pirimetamina, quando os animais foram tratados com esses dois fármacos associados, obteve-se 100% de eficácia no tratamento, ao usar apenas a azitromicina a eficácia foi de 60%, demonstrando a ação antiparasitária do fármaco.

1.10. Tratamento da toxoplasmose congênita

Quando há confirmação da infecção materna por *T. gondii*, deve-se iniciar, imediatamente o tratamento, para evitar que o feto seja contaminado (RORMAN, 2005).

Com a confirmação da infecção materna sem infecção fetal, indica-se o tratamento com espiramicina. Esse fármaco é um membro do grupo das eritromicinas, que são compostos macrolídeos, caracterizados por um anel de lactona macrocíclico (contendo, em geral, 14 ou 16 átomos de carbono) ao qual se ligam açúcares. Essas drogas atuam inibindo a síntese de proteínas do parasito (KATZUNG, 1998; REMINGTON; KLEIN, 2001).

A espiramicina não atravessa a barreira placentária, porém, ela é muito utilizada, pois retarda a transmissão da doença, o que faz com que haja redução na severidade da infecção fetal (REMINGTON; KLEIN, 2001). Estudos demonstraram que houve uma diminuição de 60% na transmissão materno-fetal de *T. gondii*, em mulheres submetidas ao tratamento com espiramicina (GRUJIC et al., 2005).

Dafos e colaboradores concluíram que apesar da espiramicina reduzir a frequência de transmissão da doença, esse medicamento não altera a patologia da infecção fetal. Sendo assim, necessário, a partir da décima oitava semana de gestação, iniciar o tratamento com sulfonamidas e pirimetamina (REMINGTON; KLEIN, 2001).

Já quando há confirmação da infecção do feto, o tratamento indicado visa atenuar a gravidade da infecção fetal, combatendo os parasitos que se encontram na placenta e nos tecidos fetais, impedindo assim a transmissão vertical da doença ou iniciando o tratamento do feto infectado (BOYER et al., 2005).

Nesse caso a terapêutica indicada é a associação: sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico, cujas doses preconizadas para seres humanos são:

- Sulfadiazina – 75mg/Kg/dia, divididas em duas doses diárias, que somadas não podem ultrapassar 4g, durante dois dias; após esses dois dias, a dose passa a ser de 100mg/Kg/dia, também dividida em duas doses diárias, não ultrapassando 4g de sulfadiazina por dia.

- Pirimetamina – 100mg/dia, divididas em duas doses diárias por dois dias; após esse período a dose recomendada é de 50mg/dia.
- Ácido Fólico – 10 a 20mg diariamente, sendo que a utilização desse fármaco ainda deve ser continuada após uma semana de término do uso da pirimetamina.

(REMINGTON & KLEIN, 2001).

Fetos cujas mães forem tratadas durante a gravidez e que nascerem positivos pra *T. gondii*, devem ser tratados com a associação durante o primeiro ano de vida, uma vez que 75% das crianças que nascem com toxoplasmose não apresentam sinais clínicos no nascimento, esses sinais podem aparecer no final da infância, na adolescência e até na vida adulta, em consequência de uma possível reativação da doença congênita (REMINGTON; KLIEN, 2001; SCHMIDT et al., 2006).

Em relação às características dos fármacos atualmente utilizados no tratamento da toxoplasmose congênita, observa-se que:

➤ Sulfadiazina

É a sulfonamida mais utilizada no tratamento da toxoplasmose, pois é a que apresenta maior ação contra *T. gondii* (REMINGTON; KLEIN, 2001).

As sulfonamidas compõem uma ampla família de drogas bacteriostáticas que são produzidas por síntese química. Em 1935, o composto primário, sulfanilamida, se tornou o primeiro agente antimicrobiano clinicamente eficaz (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

O termo sulfonamidas é utilizado para referir-se a derivados do ácido ρ -aminobenzóico (PABA). As sulfas são, normalmente, ácidos fracos, cristalinos, inodoros, amargos e solúveis em pH alcalino. Sua fórmula química é caracterizada pela presença de um núcleo ao qual foram ligados diversos radicais ao grupo amida (-SO₂NH-R) ou no qual várias substituições do grupo amino (NH₂) podem ser efetuadas (GILMAN, 1997; KATZUNG, 1998). O grupamento ρ -amino é essencial para a atividade das sulfonamidas (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

As sulfonamidas sofrem rápida absorção pelo estômago e intestino delgado e distribuem-se amplamente nos tecidos e líquidos corporais (incluindo sistema nervoso central e líquido cefalorraquidiano), placenta e feto (KATZUNG, 1998).

A utilização das sulfas pode causar efeitos colaterais típicos dos antifolatos, tais como: anemia megaloblástica, leucopenia, granulocitopenia e trombocitopenia, o que pode ser

prevenido com uma dieta materna rica em alimentos que contenham ferro (FARHAT et al., 1998; KATZUNG, 2006).

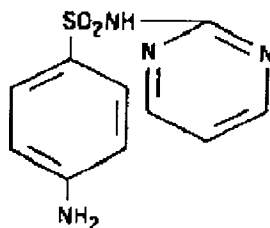


Figura 1: Estrutura química da sulfadiazina (Retirado de Katzung, 2006).

➤ Pirimetamina

É uma diaminopirimidina, antagonista dos ácidos fólico e folínico. Quando administrada por via oral possui boa absorção, mas o processo é lento. Após ser absorvida, a pirimetamina se difunde pelos tecidos e se acumula nos rins, fígado, pulmões, baço e no leite materno. Esse fármaco apresenta uma meia vida de quatro dias e se mantém, em concentrações terapêuticas, no sangue durante duas semanas após a suspensão do medicamento (FLÒREZ et al., 2003; GILMAN, 1997).

Esse fármaco atua como competidor da enzima diidrofolato redutase, que atua no processo de redução do ácido fólico em suas formas metabolicamente ativas (KATZUNG, 1998). Quando administrada em combinação com a sulfadiazina há aumento na atividade de ambos os fármacos, aumentando a eficiência no tratamento, pois as drogas agem sinergicamente contra *T. gondii*, aumentando em até oito vezes seus efeitos antiparasitários (FLÒREZ et al., 2003; REMINGTON; KLEIN, 2001).

Assim como as sulfonamidas, a pirimetamina também pode causar efeitos colaterais, o mais comum deles é a supressão da medula óssea, causando problemas hematológicos. Isso pode ser evitado administrando-se, junto com a pirimetamina, ácido folínico (FLÒREZ et al., 2003; KATZUNG, 1998).

Além disso, a pirimetamina possui efeitos teratogênicos, quando administrada em altas doses, e não se recomenda seu uso no primeiro trimestre da gestação (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

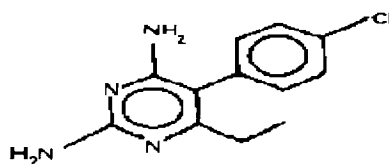


Figura 2: Estrutura química da pirimetamina (Retirado de Katzung, 1998).

➤ Ácido Fólico

É uma vitamina essencial para a síntese normal de DNA. A sua deficiência resulta em comprometimento da síntese de DNA, inibição da mitose normal e maturação e funcionamento anormais das células produzidas. O ácido fólico não é uma coenzima ativa para o metabolismo celular, por isso, ele tem que ser, após sua absorção, reduzido até se tornar ácido tetraidrofólico. A enzima responsável por essa redução é a diidrofolato redutase (uma enzima folato redutase), que converte o ácido diidrofólico em tetraidrofólico (GILMAN, 1997; KATZUNG, 2006). A via de redução do ácido fólico pode ser visualizada abaixo:

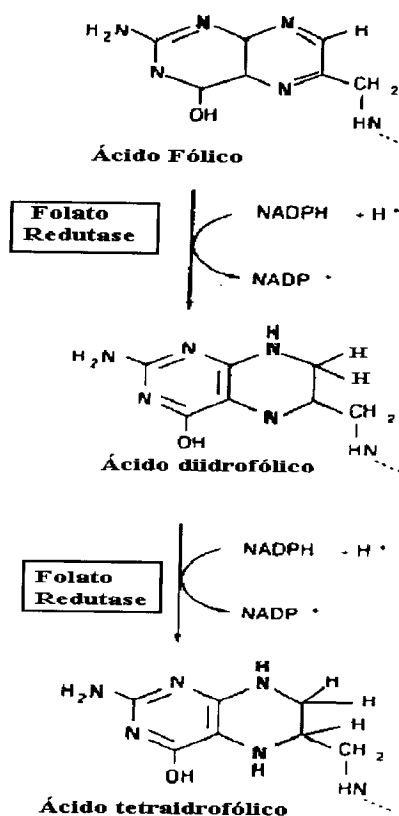


Figura 3: Via de redução do ácido fólico em ácidos diidrofólico e tetraidrofólico pela enzima diidrofolato redutase (Retirado e adaptado de Katzung, 1998).

O ácido folínico (também chamado de leucovorina) é um dos produtos metabolicamente ativos da redução do ácido fólico, é um derivado do ácido tetraidrofólico e atua como receptor de unidades monocarbônicas. O ácido folínico é importante para os parasitos, pois é a coenzima responsável pela transferência de unidades de carbono de grupos (-CH₂, -CHO, -CH₃) durante a síntese de timina, que é necessária para a síntese de DNA (KATZUNG, 1998; SILVA, 1989).

A administração do ácido folínico juntamente com a sulfadiazina e a pirimetamina é capaz de reduzir o efeito antifolato desses fármacos nas mulheres grávidas, e, assim, diminuir os efeitos tóxicos das drogas sobre a medula óssea (GILMAN, 1997; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

- **Mecanismo de ação dos fármacos contra *T. gondii***

Os derivados do ácido fólico são essenciais para várias vias metabólicas importantes do parasito, como a síntese de purinas e de ácidos nucleicos. A diidrofolato redutase (DHFR) é a enzima responsável pela manutenção de formas metabolicamente ativas do ácido fólico nas células. Já a diidropteroato sintase (DHPS) é uma das enzimas responsáveis pela síntese de moléculas do ácido fólico. Diferentemente dos mamíferos, que possuem um sistema ativo de transporte de derivados de folato pré-formados, *T. gondii* precisa sintetizar ácido fólico e reduzi-lo em formas ativas metabolicamente (ALLEGRA et al., 1990).

A sulfadiazina é um análogo estrutural do ácido *p*-aminobenzóico (PABA), necessário para a síntese do ácido fólico. Dessa forma, a sulfadiazina atua como um inibidor competitivo do PABA, se ligando a enzima diidropteroato sintase e formando análogos não funcionais do ácido fólico, o que prejudica as vias metabólicas essenciais do parasito. A sulfadiazina atua inibindo o crescimento dos parasitos e não matando os mesmos (FLÒREZ et al., 2003; KATZUNG, 2006; RANG et al., 2004). A ação seletiva das sulfonamidas é baseada no fato dos protozoários sintetizarem seu próprio ácido fólico a partir de precursores do PABA, enquanto as células humanas requerem ácido fólico pré-formado e ultrapassam a etapa na qual as sulfonamidas atuam (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

A pirimetamina atua em sinergismo com a sulfadiazina. Quando há a síntese de ácido fólico nos parasitos, a pirimetamina atua inibindo a diidrofolato redutase e, assim, não há redução do ácido fólico em suas formas metabolicamente ativas (KATZUNG, 2006). A diidrofolato

redutase dos parasitos é 50.000 – 100.000 vezes mais sensíveis a pirimetamina que a enzima equivalente no ser humano (FLÒREZ et al., 2003; RANG et al., 2004).

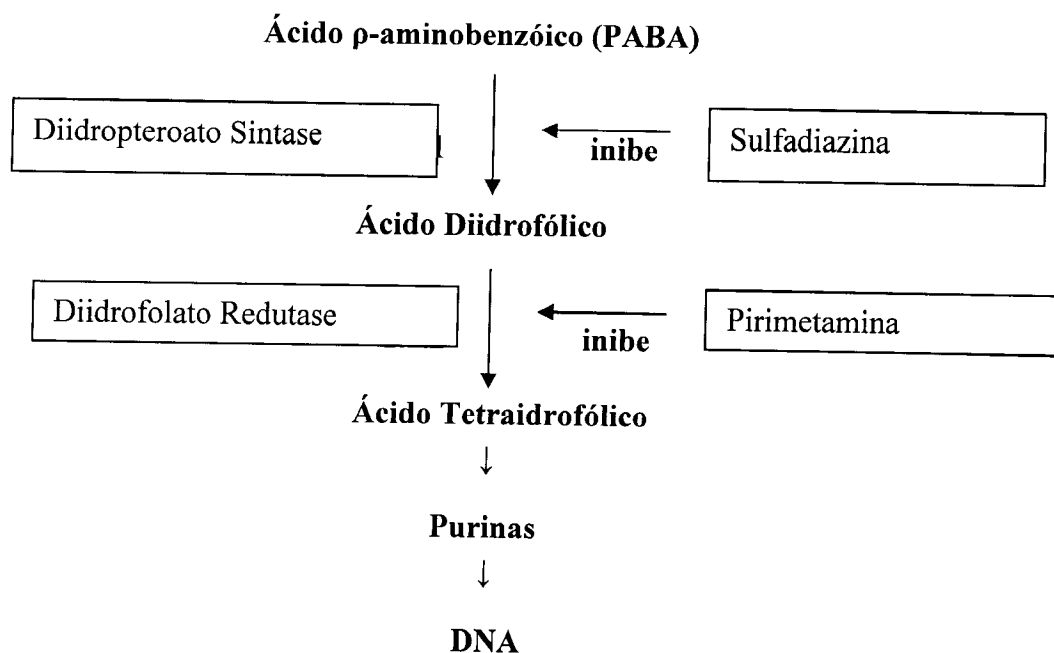


Figura 4: Mecanismo de ação das sulfonamidas e da pirimetamina no organismo dos parasitos (Retirado e adaptado de Katzung, 2006).

Apesar da existência do tratamento para a toxoplasmose congênita há trinta anos, não se sabe se o tratamento pré-natal é realmente eficaz, ou ainda qual o real mecanismo de ação dos fármacos nas mulheres e nos fetos submetidos ao tratamento (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; PINARD et al., 2003). Além disso, devido aos poucos estudos realizados até o presente, não é possível determinar os reais riscos e efeitos dos tratamentos durante a gravidez (JONES et al., 2001). Grande porcentagem das mulheres que são tratadas com a associação desenvolve algum tipo de efeito colateral, como problemas hematológicos causados pela pirimetamina e trombocitopenia, causada pela sulfadiazina (DANTAS-LEITE et al., 2005).

Foi realizado um estudo entre mulheres grávidas e positivas para *T. gondii*, submetidas ou não ao tratamento com a associação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico. A transmissão materno-fetal da doença, em mulheres que não foram tratadas, foi de 72%, enquanto que, 39% das mulheres tratadas transmitiram o parasito aos seus fetos. Nesse mesmo estudo, ainda verificou-se que entre as mulheres não tratadas, 20% tiveram crianças com graves seqüelas, e,

que em apenas 3,5% mulheres que foram submetidas ao tratamento as crianças apresentavam esse quadro (JONES et al., 2001).

Outros autores, entretanto, sugerem que, com base nas observações feitas até hoje, o tratamento durante a gravidez não está associado com diminuição da transmissão materno-fetal da doença. E sim, com a redução das seqüelas das crianças que nascem com toxoplasmose congênita (JONES et al., 2003).

Estudos recentes, feitos em crianças com toxoplasmose congênita e submetidos ao tratamento com a associação, demonstraram que essas drogas são bem toleradas pelas crianças. Não se observaram efeitos colaterais como anemia, trombocitopenia e o tratamento não interferiu no ganho de peso das crianças (SCHMIDT et al., 2006).

Dessa forma, deve-se realizar estudos criteriosos sobre o tratamento da toxoplasmose congênita, já que esse segue controverso e amplamente indicado às mulheres grávidas e positivas para *T. gondii* (RORMAN, 2005).

1.11. Placenta

A placenta é um órgão fundamental para o sucesso gestacional. Ela é composta por uma parte materna e uma parte fetal e é o local onde há trocas fisiológicas entre o sangue materno e o do feto. Entre as substâncias envolvidas nessas trocas estão: oxigênio, gás carbônico, água, nutrientes, anticorpos maternos, entre outras. Além da função de trocas, a placenta ainda secreta hormônios que contribuem para o sucesso da gestação (CARLSON, 1996; LARSEN, 1993).

Como há trocas entre o sangue materno e fetal na placenta, alguns patógenos podem ultrapassar a barreira placentária e alcançar os tecidos fetais. Entre eles estão vírus, bactérias e protozoários, incluindo *Toxoplasma gondii*. Durante a parasitemia materna o parasito invade e se multiplica no interior das células placentárias, levando à lise dessas células ganhando a circulação placentária e, posteriormente, a fetal, causando infecções que podem levar até à morte do feto (LARSEN, 1993; REMINGTON; KLEIN, 2001).

Diversas drogas também podem atravessar a barreira placentária, atingindo tecidos fetais e, conseqüentemente, expondo o feto aos efeitos dessas drogas. Isso pode ocorrer por difusão passiva simples ou ativamente, através de processos dependentes de energia. Alguns fatores influenciam na passagem transplacentária das drogas, como: solubilidade em lipídios, grau de

ionização, peso molecular, área da interface materno-fetal, fluxo sanguíneo placentário, estágio da gestação e o metabolismo da placenta (REMINGTON; KLEIN, 2001).

No que diz respeito à utilização de fármacos para prevenir toxoplasmose congênita, alguns fatores inerentes a estas substâncias são determinantes para a transposição dos fármacos da placenta para o feto. Dentre eles pode-se destacar: as propriedades físico-químicas do fármaco; a velocidade com que o fármaco atravessa a placenta e a quantidade que alcança o feto; a duração de exposição ao fármaco; as características de distribuição do fármaco em diferentes tecidos do feto; o estágio de desenvolvimento placentário e fetal na época de exposição ao fármaco; e os efeitos de fármacos utilizados em combinação (KATZUNG, 1998).

1.12. Modelo experimental *Calomys callosus*

C. callosus, que pertencem à família Cricetidae, são roedores sul-americanos e podem ser encontrados em diferentes biomas do território brasileiro. Esses animais são muito estudados, devido a grande adaptabilidade que possuem em laboratórios (MELLO, 1978).

Em termos reprodutivos, *C. callosus* são animais poliétricos e possuem um ciclo estral de aproximadamente seis dias e um período gestacional de cerca de 22 dias. O processo de implantação embrionária inicia-se no quarto dia de gestação e ocorre de forma mais rápida do que o observado em outros roedores (FERRO, 1991; MELLO, 1978).

Esses animais são muito importantes no que diz respeito à saúde pública, uma vez que podem servir como reservatórios de parasitos causadores de diversas doenças, como a doença de Chagas, leishmaniose e toxoplasmose (FERRO, 2000).

No que diz respeito à toxoplasmose, estudos prévios demonstraram que *C. callosus* são susceptíveis a essa doença (FAVORETTO et al., 1998). Além disso, Ferro e colaboradores (2002) demonstraram que a transmissão congênita da toxoplasmose em *C. callosus*, infectados com a cepa ME49 de *T. gondii*, ocorre apenas na fase aguda da doença, semelhante ao observado na espécie humana. Isso faz com que esses animais constituam em bom modelo para o estudo experimental da toxoplasmose congênita.

1.13. Placenta de *C. callosus*

Calomys callosus, assim como outros roedores, possuem placenta do tipo hemocorial. Ou seja, o córion é diretamente banhado por sangue materno, semelhante ao observado na espécie humana (CARLSON, 1996; RUGH, 1967).

A placenta de *C. callosus* possui três regiões típicas: camada decidual, zona juncional e zona do labirinto. As duas primeiras regiões são de origem materna e só há presença de sangue materno nelas. Já na zona do labirinto há tanto sangue materno quanto fetal (FERRO, 2000; RUGH, 1967).

A camada decidual é formada por células deciduais, que além de apresentarem importante papel na contenção da invasão do trofoblasto, ainda secretam hormônios, fatores de crescimento, citocinas e peptídeos. A zona juncional é composta por células granulosas metriais, espongiotrofoblasto e células trofoblásticas gigantes, e caracterizam-se pela produção de hormônios como a progesterona, o lactogênio placentário e a prolactina (FERRO, 2000).

A região do labirinto, formada por células trofoblásticas, constitui-se na maior parte da placenta. Essa é a região de trocas propriamente dita, pois além da presença do sangue materno extravasado, recebe também sangue fetal contido no interior de vasos (FERRO, 2000). A zona do labirinto apóia-se sobre a membrana de Reichert, que é uma camada extraembrionária protetora, presente apenas em roedores (RUGH, 1967).

A transmissão congênita da toxoplasmose em *C. callosus* foi determinada através de experimentos realizados por Ferro e colaboradores (2002), que determinaram a cinética da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas de *C. callosus*, infectados no primeiro dia de gestação com 20 cistos de *T. gondii*, cepa ME49. Através desses experimentos, observou-se que a infecção placentária de *C. callosus* inicia-se no 15º dia de gestação e infecção, e as primeiras células infectadas são as trofoblásticas gigantes. No 16º dia, foi possível a visualização de parasitos na zona do labirinto. Nos dias subseqüentes (17º e 18º), a infecção não extrapolou a região de células trofoblásticas gigantes e a zona do labirinto. No 19º dia, observou-se parasitos no espongiotrofoblasto. Dessa forma, notou-se que as primeiras células a serem infectadas são as trofoblásticas gigantes, que se posicionam na parede dos vasos sanguíneos materno, seguidos pelas células do labirinto. Já as células do espongiotrofoblasto são infectadas tardiamente, provavelmente, por ficarem isoladas, pelas células trofoblásticas gigantes, do sangue materno.

Durante a fase crônica não se observou transmissão congênita de *T. gondii*, pois mesmo após cem dias da infecção materna, não se detectou parasitos nas placentas e tecidos fetais (FERRO et al., 2002).

Estudos anteriores demonstraram que as células trofoblásticas de *C. callosus*, são infectadas no início da gestação, ainda durante o processo de implantação embrionária. Sendo que as únicas células infectadas nesse período são as células trofoblásticas gigantes, devido à habilidade que essas células possuem de interagir com componentes do sangue materno (FERRO et al., 1999).

Dessa forma, *Calomys callosus* se constitui num importante modelo experimental no estudo da toxoplasmose congênita. Além disso, em nosso meio, a toxoplasmose apresenta importante incidência, somado às graves repercussões na criança afetada, a precariedade da atenção pré-natal, na maioria dos serviços de saúde pública, e principalmente pela terapêutica difícil e pouco estudada, faz-se necessários estudos que viabilizem o entendimento de mecanismos da ação e eficácia dos tratamentos para esta importante zoonose.

Assim, o melhor conhecimento da natureza dos fármacos utilizados no tratamento da toxoplasmose congênita, possibilitará maior grau de segurança para uso de tratamentos que propiciem maior proteção materno/fetal, minimizando as manifestações oriundas da transmissão vertical da doença.

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivos:

1. Analisar os aspectos morfológicos da placenta de *C. callosus* que apresentaram toxoplasmose congênita, tendo sido submetidos ou não a tratamento quimioterápico.
2. Verificar a evolução seqüencial da infecção nos diferentes compartimentos placentários de *C. callosus*.
3. Determinar se a infecção da placenta e a transmissão materno-placentária são amenizadas mediante o tratamento quimioterápico
4. Avaliar se *C. callosus* é um modelo experimental apropriado para estudo de drogas para o tratamento da toxoplasmose congênita.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais de experimentação

Como modelo experimental utilizou-se o roedor *Calomys callosus* (linhagem Canabrava). Os animais utilizados tinham em média três meses de idade, eram negativos para *T. gondii* e as fêmeas usadas nos experimentos eram virgens.

No decorrer do experimento os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia sob dieta *ad libitum*, água e ração granulada complementada com semente de girassol, milho e aveia.

2.2. Cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*

Para realização desse trabalho utilizou-se a cepa ME49 de *T. gondii*. Estudos prévios demonstraram que *C. callosus* são resistentes à cepa ME49, tornando – a ideal para estudos com toxoplasmose congênita nesse modelo experimental (FERRO et al., 2002; PEREIRA, 1998).

Durante o experimento a cepa foi mantida em *C. callosus*, previamente infectados com 20 cistos de *T. gondii*. Após um período de 30 a 40 dias de infecção, esses animais foram sacrificados, os cérebros coletados e utilizados como doadores de cistos de *T. gondii* para as fêmeas usadas nos experimentos.

2.3. Acasalamento

Fêmeas virgens e com sorologia negativa para *T. gondii*, foram colocadas em gaiolas, na proporção de duas fêmeas para um macho, para que ocorresse o acasalamento.

A rolha vaginal é uma mistura de sêmen e secreção vaginal e é formada em decorrência do acasalamento. Todos os dias, pela manhã, verificou-se se o acasalamento havia acontecido, sendo que, considerou-se o primeiro dia de gestação aquele no qual observou-se a rolha vaginal. Nesse mesmo dia as fêmeas foram anestesiadas com 0,1 ml de uma mistura (1:1) de cetamina (Ketalar, Bayer S. A., São Paulo) e 2% de cloridrato de 2-(2,6 – xilidino)- 5,6-dihidro – 4H – 1,3 – tiazina (Rompun, Bayer S. A., São Paulo) e sangradas via plexo retro – orbital para posterior confirmação da não infecção por *T. gondii*, através do método sorológico ELISA.

2.4. Infecção por *Toxoplasma gondii* e tratamento dos animais infectados

As fêmeas foram infectadas no primeiro dia de gestação. Para realização do inóculo, os animais doadores foram sacrificados. Abriu-se o crânio desses animais e coletou-se o encéfalo, sendo este macerado, com auxílio de pistilo, banhado em 1 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e homogeneizado por aspiração em seringa de 5 ml e agulha de 25 x 7 mm. Em seguida, adicionou-se ao material mais 10 ml de PBS estéril e este foi submetido à centrifugação por 5 minutos, a 500 g, em temperatura de 24° C, por duas vezes. Após a centrifugação, adicionou-se uma quantidade de 20µL da suspensão em uma lâmina, que foi coberta por uma lamínula. A lâmina foi levada ao microscópio de luz e na objetiva de 10X procedeu-se à contagem dos cistos. Após a contagem, calculou-se a concentração de 20 cistos de *T. gondii* por animal, em 0,5 ml de PBS. Após os cálculos o inóculo foi administrado às fêmeas, via oral, através de uma seringa adaptada. Após 14 dias de gestação e inóculo, as fêmeas começaram a ser tratadas com a associação de fármacos composta por sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico. Os medicamentos foram previamente dissolvidos em PBS e nos horários do tratamento retirava-se a dose respectiva e administrava – se, à fêmea.

As doses utilizadas na administração dos fármacos seguiram o protocolo recomendado para o tratamento de seres humanos (REMINGTON; KLEIN, 2001). Porém a dosagem de cada fármaco foi adaptada ao peso de *Calomys callosus* (30 gramas), como pode ser visualizado na tabela abaixo:

| Fármacos | Doses preconizadas para <i>Calomys callosus</i> |
|-----------------------|---|
| Sulfadiazina | Nos dois primeiros dias de tratamento: 1,125 mg/dose (duas vezes ao dia). |
| | No restante do tratamento: 1,500 mg/dose (duas vezes ao dia). |
| Pirimetamina | Nos dois primeiros dias de tratamento: 50 mg/dose (duas vezes ao dia). |
| | No restante do tratamento: 50 mg/dose (uma vez ao dia). |
| Ácido Folínico | Durante todo o tratamento: 15 mg/dose (uma vez ao dia). |

Cada dose foi administrada ao animal com 0,5 ml de PBS, via oral através de uma seringa adaptada. Os fármacos não eram administrados concomitantemente para evitar alterações na composição química das drogas.

Utilizou-se nesse experimento 16 fêmeas de *C. callosus*. Os animais foram divididos em quatro grupos, cada um era composto por quatro fêmeas e foram submetidos a diferentes experimentos. Dois grupos passaram pelo mesmo procedimento, ou seja, foram infectados e posteriormente tratados, sendo que um deles foi chamado de grupo de repetição. Os outros dois grupos serviram de controle positivo e negativo. No controle positivo as fêmeas foram infectadas, mas não receberam tratamento com os fármacos, administrou-se a elas apenas PBS. Enquanto que no controle negativo, não houve infecção, apenas tratamento das fêmeas.

2.5. Sacrifício das fêmeas e coleta do material

As fêmeas de todos os grupos foram sacrificadas com 17, 18, 19 e 20 dias de gestação e inóculo, 3, 4, 5 e 6 dias de tratamento, respectivamente. Nos dias dos sacrifícios, foi realizada uma nova sangria em cada fêmea, para confirmar a infecção através de análise sorológica, também feita pelo teste ELISA. Em seguida, os animais foram sacrificados e laparatomizados, para remoção do útero e subsequente coleta das placentas, as quais foram posteriormente processadas para análise ao microscópio de luz, bem como estudo imunohistoquímico.

2.6. Processamento do material para análise morfológica em microscopia de luz

Depois de fixados, com uso de formol 10% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, os materiais foram desidratados em série etílica (70-100%) e incluídos em Paraplast. As amostras foram seccionadas a 4µm e os cortes foram corados em hematoxilina-eosina, para análise morfológica do material. Em seguida procedeu-se à montagem de lâminas para observação ao microscópio de luz.

As amostras também foram fixadas em formol a 10 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7, 4, e processadas rotineiramente para a inclusão em glicol metacrilato (Historesin, LKB, Bromma, Suécia). Após a inclusão, as amostras foram seccionadas a 2 µm, os cortes foram depositados em lâminas histológicas e corados com Azul de Toluidina, para posterior análise morfológica em microscopia de luz.

Os materiais foram analisados e fotografados em microscópio de luz Nikon, modelo Optiphot –2.

2.7. Imunohistoquímica para microscopia de luz

Além da análise morfológica das placentas, realizaram-se também reações imunohistoquímicas para detecção e posterior contagem de parasitos.

Foram feitas duas reações imunohistoquímicas, uma para verificar a presença de taquizoítas utilizando-se anticorpo policlonal anti – cepa RH de *T. gondii*, e outra para detecção de bradizoítas, utilizando o anticorpo policlonal anti-BAG5, que serão descritas a seguir:

2.8. Imunohistoquímica para a detecção de taquizoítas

Os cortes foram desparafinizados, hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e por fim em água corrente. Após hidratação, os cortes foram incubados por oito minutos em solução de ácido acético a 5 % para bloqueio da fosfatase endógena, em seguida lavados em água corrente e em solução salina tamponada com TRIS 0,05 M, pH 7,4, acrescida de 2,5 % de cloreto de Sódio (TBS) por 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro normal de cabra a 2 % em TBS por 20 minutos a 37° C; após este bloqueio, foi feita a incubação do material com anticorpo policlonal de coelho dirigido contra cepa RH *T. gondii*, na diluição de 1: 100 (produzido e cedido pelo Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia - Lab. ImUFU) em TBS por 12 horas a 4° C. Após sucessivas lavagens em TBS, as lâminas foram incubadas com IgG de cabra anti - IgG de coelho biotínilada (Sigma, St Louis, USA) na diluição de 1: 600 em TBS por uma hora a 37° C. Após sucessivas lavagens, a reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC) - fosfatase (Biomed, Foster city, USA) na diluição de 1:100 em TBS, a 37° C por 30 minutos. Após novas lavagens em TBS, houve a revelação da enzima fosfatase alcalina com fast red – naftol (Sigma, St Louis, USA), em tampão TRIS, lavagens em TBS e água corrente e contra - coloração com hematoxilina de Meyer, por 8 minutos à temperatura ambiente. Após a diferenciação do corante em água amoniacal, as lâminas foram montadas com lamínulas em glicerina. Como controle da reação foram utilizadas lâminas com material proveniente de fêmeas dos grupos controles negativo e positivo (FERRO, 2000).

2.9. Imunohistoquímica para detecção de bradizoítas

A reação imunohistoquímica realizada para detectar bradizoítas foi semelhante à realizada para detecção de *T. gondii*, exceto pela utilização do anticorpo primário policlonal de coelho anti – BAG-5, na diluição de 1:1000. O processo de revelação da reação foi o mesmo da imunohistoquímica anti – *T. gondii*, como citado acima.

2.10. Teste ELISA

Sensibilizou-se placas de poliestireno (Corning, New York – USA), com antígeno solúvel da cepa RH de *T. gondii* a uma concentração protéica igual a 10µg/ml em tampão carbonato – bicarbonato de sódio a 0,06M, pH 9,6, por 18 horas a 4°C, overnight. No dia seguinte, realizou-se a lavagem das placas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBST) por três ciclos de 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 50µL/poço das amostras de soros diluídas a 1:16 em PBST, em duplicata. Paralelamente, adicionaram-se soros controles positivo e negativo nas mesmas diluições. Como controle do conjugado, omitiram-se as amostras de soros, adicionando-se em seu lugar 50µL de PBST. Após incubação de 1 hora a 37°C, lavou-se três vezes em PBST durante 5 minutos. O conjugado (IgG de coelho anti-gamaglobulina de *Calomys callosus* marcada com peroxidase) foi adicionado na diluição de 1:500 em PBST e as placas incubadas por uma hora a 37°C. As placas foram então lavadas como descrito anteriormente e adicionou-se o substrato enzimático (solução reveladora), que consistiu de peróxido de hidrogênio (água oxigenada), a 0,03% em tampão cromógeno OPD (ortofenilenodiamina, Merck) diluídos em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0. Após adição da solução reveladora, incubou-se por 20 minutos, a temperatura ambiente, em câmara escura. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25µL de solução de ácido sulfúrico 2M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492nm.

Os resultados das amostras foram expressos por meio do Índice ELISA, a partir da conversão dos valores de densidade óptica, como proposto por Turunen e colaboradores (1983), usando-se a seguinte fórmula:

$$IE = (DO_x - Don) / (DO_p - Don) \times 100$$

Onde:

IE = Índice ELISA

DO_x = densidade óptica média da amostra

DO_n = densidade óptica média dos controles negativos

DO_p = densidade óptica média dos controles positivos.

Para determinação do Índice ELISA (IE), estabeleceu-se um valor igual a 1,32 como limite de discriminação de reatividade (“Cutoff”). Dessa forma, as amostras com valores iguais ou maiores que 1,32 foram positivas para anticorpos anti-*T. gondii*.

2.11. Análise quantitativa de parasitos

Para verificar se houve diminuição no número de parasitos, procedeu-se à contagem de imunomarcações dos parasitos nos tecidos placentários, provenientes de fêmeas infectadas, submetidas ou não ao tratamento com a associação de fármacos. A contagem foi feita através das lâminas que foram submetidas à reação de imunohistoquímica. Dessa forma, além da quantificação de imunomarcações em placentas de animais tratados e não tratados, quantificou-se também de bradizoítas e taquizoítas, separadamente.

Para isso, realizou-se a contagem de imunomarcações utilizando o método de captura de imagem em microscópio óptico BX 40 da marca Olympus, com uso de objetiva de 40X, acoplado a câmera JVC TK-1085U, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora “Translation” 3153. O programa utilizado foi o HLIImage++97. A contagem foi realizada por área da placenta, a qual foi determinada pelo programa de acordo com o aumento do microscópio utilizado na captura das imagens. A contagem foi realizada no aumento de 40X e a área determinada pelo programa foi de 0,01872 mm².

A análise foi feita em três cortes de placenta, sendo que, foram feitas vinte imagens da região da decídua, vinte da zona juncional e vinte da zona do labirinto, totalizando sessenta imagens. O número de imunomarcações de parasitos, por corte de placenta, foi determinado pela fórmula:

$$\text{Número de imunomarcações (mm}^2\text{)} = \frac{\text{número de imunomarcações contadas}}{0,01872 \times \text{número de imagens}}$$

Após a determinação dos valores reais, pela fórmula, realizou-se a análise estatística dos valores.

2.12. Análise estatística

Os dados foram expressos como médias e \pm desvio padrão (SD) dos valores reais. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas utilizando-se teste não-paramétrico Mann Whitney (GraphPad Prism 3.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Teste ELISA

Os testes realizados com sangues provenientes de sangrias pré-inóculo apresentaram resultados negativos para *T. gondii*. Já os testes feitos com sangue coletado no dia do sacrifício das fêmeas, ou seja, após o inóculo, tiveram resultados positivos para o parasito.

Os testes realizados com sangue do grupo controle negativo apresentaram resultados negativos para *T. gondii*.

3.2. Análise morfológica ao microscópio de luz

A placenta de *C. callosus* mostrou-se constituída de três camadas típicas: camada decidual, zona juncional e zona do labirinto.

A camada decidual era composta, principalmente, por células deciduais. Essas células apresentavam um aspecto globoso com núcleos esféricos e nucléolos evidentes. Interpostas às células deciduais, observaram-se as células granulosas metriais, que são células globosas ou irregulares e apresentam grânulos citoplasmáticos (Figura 1A). Essas células foram observadas em volta dos vasos sanguíneos maternos.

A zona juncional era constituída por células trofoblásticas gigantes e espongiotrofoblastos. As células trofoblásticas gigantes apresentaram núcleo excêntrico e eucromático, com um ou mais nucléolos evidentes. Essas células foram observadas envolvendo os espongiotrofoblastos (Figura 1B). Os espongiotrofoblastos apresentaram-se como células de arranjo típico, com aspecto esponjoso. Puderam-se observar amplos espaços regulares entre as células, que apresentavam núcleo excêntrico e eucromático, com um ou mais nucléolos evidentes (Figura 1B).

A zona do labirinto constituiu a maior região da placenta e era formado por células trofoblásticas, que se apresentaram com formas irregulares, núcleo excêntrico e um ou mais nucléolos evidentes (Figura 1B).

Pôde-se observar na zona do labirinto, sangue materno extravasado. Esta região, ao contrário das anteriores, recebia sangue fetal, contido no interior de vasos sanguíneos fetais, provenientes do mesênquima.

Observou-se também, que a zona do labirinto apoiava-se em uma membrana basal espessa, a Membrana de Reichert, a qual estava intimamente aderida ao endoderma parietal.

Após a infecção por *Toxoplasma gondii*, não se observou nenhuma alteração morfológica na placenta, além da presença de parasitos nas diferentes camadas placentárias.

A análise de placentas provenientes de fêmeas não infectadas e tratadas (controle negativo) revelou que não houve alterações morfológicas na placenta decorrentes do tratamento.

3.3. Análise imunohistoquímica

Através do teste de imunohistoquímica pôde-se observar a infecção, por *Toxoplasma gondii*, nos diferentes compartimentos placentários de *Calomys callosus*. Como as fêmeas foram sacrificadas a partir do décimo sétimo dia de gestação e inóculo, a análise da infecção foi feita dessa data até o vigésimo dia de gestação e inóculo.

No décimo sétimo e décimo oitavo dias de gestação e inóculo a infecção acometia a região das células trofoblásticas gigantes e a zona do labirinto. A partir do décimo nono dia de gestação e inóculo pôde-se observar parasitos na região do espongiotrofoblasto, sendo que, no vigésimo dia todas as camadas placentárias apresentavam-se infectadas.

A análise de placentas provenientes de fêmeas infectadas e tratadas não revelou alterações na seqüência da infecção nos compartimentos placentários.

A análise das lâminas com imunomarcações de taquizoítas revelou que, placentas provenientes de fêmeas infectadas e não tratadas (controle positivo) apresentaram maior quantidade de imunomarcações, sugerindo maior quantidade de parasitos na placenta (Figura 1C). Já a análise de placentas oriundas de fêmeas infectadas e tratadas demonstrou que a quantidade de imunomarcações era menos intensa, indicando menor quantidade de parasitos nos tecidos placentários (Figura 1D).

Imunomarcações de bradizoítas foram visualizadas em placentas provenientes de fêmeas controle positivo, com 19 dias de gestação e inóculo (Figura 1E) e de fêmeas infectadas e submetidas ao tratamento (Figura 1F). Não observou-se imunomarcações em tecidos placentários provenientes de fêmeas tratadas com 17, 18 e 20 dias de gestação e inóculo, 3, 4 e 6 dias de tratamento, respectivamente.

3.4. Análise estatística

As análises imunohistoquímicas revelaram alterações na carga parasitária em placentas de fêmeas tratadas. Os resultados demonstraram que houve diminuição na quantidade de parasitos em tecido placentários de fêmeas submetidas ao tratamento com a associação. Após a análise dos valores totais de imunomarcações nas placentas, pôde-se verificar que há diferença estatística significativa na quantidade de imunomarcações de taquizoítas entre fêmeas controle positivo ou tratadas. O número de imunomarcações de taquizoítas é menor em tecidos placentários provenientes de fêmeas tratadas, do que de animais não tratados. No caso de imunomarcações de bradizoítas, também há diferença estatística entre animais controle positivo e tratados. Verificou-se também que há diferença estatística significante no número de imunomarcações de taquizoítas e bradizoítas em animais controle positivo ou tratados. Sendo que, o número de imunomarcações de taquizoítas é sempre maior do que o de bradizoítas (Gráfico 1).

A análise de imunomarcações de taquizoítas, nas diferentes idades gestacionais, revelou que há diferença estatística significativa, entre animais controle positivo e tratados, com 17, 18, 19 e 20 dias de gestação e inóculo. Sendo que, animais tratados apresentaram menor número de imunomarcações do que os animais controle positivo, em todas as idades gestacionais. Há diferença estatística também entre animais tratados de 17 e 20 dias e de 18 e 20 dias. Fêmeas com 20 dias de gestação/inóculo e 6 dias de tratamento, apresentaram menos imunomarcações para o parasito, do que fêmeas com 17 e 18 dias de gestação/inóculo, 3 e 4 dias de tratamento, respectivamente (Gráfico 2).

A análise de imunomarcações de bradizoítas mostrou que há diferença estatística significativa no número de imunomarcações entre animais controle positivo e tratados nas diferentes idades gestacionais. Placentas provenientes de fêmeas controles positivo de 17, 18 e 20 dias de gestação e inóculo, não apresentaram imunomarcações de parasitos. Já animais tratados, dessas mesmas idades gestacionais, apresentaram imunomarcações para bradizoítas. Observaram-se imunomarcações em fêmeas de 19 dias de gestação e inóculo, submetidas ou não ao tratamento. Pôde-se observar também diferença estatisticamente significante entre fêmeas tratadas de 17 e 18 dias de gestação e inóculo, 3 e 4 dias de tratamento, respectivamente. Fêmeas com 3 dias de tratamento apresentaram menor quantidade de imunomarcações para bradizoítas do que fêmeas com 4 dias de tratamento (Gráfico 3).

Houve aumento no número de imunomarcações de bradizoítas em fêmeas com 4 e 5 dias de tratamento, quando comparado a fêmeas com 3 dias de tratamento. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Gráfico 3).

4. DISCUSSÃO

4.1. Análise morfológica da placenta de *C. callosus*

A placenta de *C. callosus* apresentou-se constituída por três regiões: camada decidual, zona juncional e zona do labirinto. Esta distribuição morfológica é característica de outros roedores, como ratos e camundongos (ZUCKERMAN; HEAD, 1986).

A camada decidual constitui-se a parte materna da placenta e observou-se a presença de vasos sanguíneos maternos próximos às células granulosas metriais. A disposição e aspecto celular da decídua de *C. callosus* foi semelhante ao observado na placenta de outros roedores (CROY et al., 1991).

A zona juncional e do labirinto corresponderam à parte fetal da placenta, sendo que observou-se sangue fetal apenas na região do labirinto.

A zona juncional apresentou-se formada por células granulosas metriais, que envolviam os vasos sanguíneos maternos. Observaram-se também células trofoblásticas gigantes, que situavam-se ao redor dos espongiotrofoblastos, células em forma de esponja. Esse aspecto da zona juncional é semelhante ao descrito em ratos (JOLLIE, 1965).

A região do labirinto correspondeu à maior área da placenta, pois é o local onde ocorrem as trocas fisiológicas materno/fetal (FERRO, 2000). Pôde-se verificar sangue materno extravasado, banhando as células trofoblásticas, e sangue fetal, contido em vasos sanguíneos. Não observou-se mistura entre o sangue materno e fetal. Notou-se também que, com o decorrer da gestação a espessura das camadas trofoblásticas tornou-se cada vez mais delgada, como descrito por Ferro (2000) e semelhante ao que ocorre em ratos e camundongos (TAKATA et al., 1997).

A sulfadiazina e a pirimetamina podem causar alguns efeitos colaterais, como problemas hematológicos e alergias (KATZUNG, 2006). Além disso, há relatos na literatura de efeitos teratogênicos causados pela administração da pirimetamina (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Porém, a análise morfológica de placentas provenientes de fêmeas tratadas e não infectadas (controle negativo), não revelou nenhuma alteração na morfologia placentária descrita anteriormente. Sendo assim, não é possível associar o tratamento, com a associação de fármacos, a alterações morfológicas na placenta de *Calomys callosus*.

4.2. Análise imunohistoquímica da placenta de *C. callosus*

A seqüência da infecção por *T. gondii*, nos diferentes compartimentos placentários de fêmeas submetidas ao tratamento, foi à mesma da observada em placentas de fêmeas não tratadas (controle negativo), e a descrita por Ferro (2000). No décimo sétimo e décimo oitavo dias de gestação e inóculo visualizou-se parasitos nas células trofoblásticas gigantes e na zona do labirinto. No décimo nono dia, a infecção atingiu os espongiotrofoblastos. Dessa forma, observou-se que as células trofoblásticas gigantes e a zona do labirinto foram infectadas antes dos espongiotrofoblastos.

A infecção tardia dos espongiotrofoblastos pode ser explicada pelo fato dessas células ficarem isoladas do sangue materno, pelas células trofoblásticas gigantes, que se posicionam na parede dos vasos sanguíneos maternos. A zona do labirinto apresentou infecção anterior à dos espongiotrofoblastos, pois é diretamente banhada pelo sangue materno, facilitando o contato das células dessa região com o parasito (FERRO et al., 2002).

Quando há confirmação da infecção fetal, o tratamento recomendado é a associação de fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (RORMAN, 2005). Dessa forma, o tratamento não elimina a infecção materna, mas sim, diminui a quantidade de parasitos, diminuindo a transmissão materno/fetal e, conseqüentemente, atenua as seqüelas fetais (BOYER et al., 2005; REMINGTON; KLEIN, 2001).

O número total de imunomarcações de taquizoítas nas placentas foi significativamente menor em fêmeas que receberam tratamento, indicando que houve diminuição na carga parasitária da placenta e, provavelmente, diminuiu a quantidade de parasitos transmitida aos fetos, como relatado na literatura.

A análise da quantidade de imunomarcações de taquizoítas nas diferentes idades gestacionais, em fêmeas tratadas ou não tratadas, indicou a atuação dos fármacos nos parasitos. Em todas as idades gestacionais houve diferença estatística significativa entre animais controle positivo e tratados. Placentas provenientes de fêmeas tratadas sempre apresentaram menor quantidade de imunomarcações de taquizoítas. Além disso, placentas provenientes de fêmeas com 17 e 18 dias de gestação/inóculo, 3 e 4 dias de tratamento, respectivamente, apresentaram menor número de imunomarcações de taquizoítas do que tecidos placentários de fêmeas com 20 dias de gestação/inóculo e 6 dias de tratamento. Indicando que quanto maior tempo de

tratamento, mais os tecidos placentários e os parasitos ficam expostos a ação das drogas, e menor a é quantidade de imunomarcações de taquizoítas na placenta.

Essa diminuição na quantidade de imunomarcações de taquizoítas, e conseqüentemente, da carga parasitária nas placentas de fêmeas tratadas, pode ser explicada pelo mecanismo de ação da associação de fármacos utilizada no tratamento da toxoplasmose congênita.

A sulfadiazina e a pirimetamina atuam na via do ácido fólico de *Toxoplasma gondii*, que é uma via metabólica essencial para a sobrevivência do parasito (KATZUNG, 2006).

A sulfadiazina é um análogo estrutural do ácido p – aminobenzóico (PABA) e, no organismo do parasito, ela atua como um inibidor competitivo do PABA. O ácido p – aminobenzóico participa da via do ácido fólico e é convertido, após etapas sucessivas, em ácido tetraidrofólico, forma metabolicamente ativa do ácido fólico. Dessa forma, a sulfadiazina participa da reação no lugar do PABA, competindo com este pela enzima diidropteroato sintase, e assim, prejudica a síntese do ácido fólico do parasito (KATZUNG, 2006).

A pirimetamina também atua na via do ácido fólico, porém, ela compete pela enzima diidrofolato redutase, que é responsável por converter o ácido diidrofólico em ácido tetraidrofólico (KATZUNG, 1998). Sendo assim, a via de redução do ácido fólico, fica prejudicada causando danos aos parasitas, uma vez que essa via é essencial para síntese de purinas, que serão utilizadas na síntese de DNA, RNA e lipídeos do parasito (JONES et al., 2001; MONTOYA & LIESENFELD, 2004).

Estudos *in vitro* demonstraram que o estresse celular de *T. gondii* pode levar à diferenciação de taquizoítas em bradizoítas, que induzem a formação de cistos teciduais (SULLIVAN; HAKIMI, 2006). Porém não há estudos que comprovem isso *in vivo* (FERGUSON, 2004).

Nesse trabalho verificou-se que placentas provenientes de fêmeas tratadas, com 17, 18 e 20 dias de gestação/inóculo, 3, 4 e 6 dias de tratamento, respectivamente, apresentaram imunomarcações para bradizoítas. Enquanto que, em placentas de fêmeas controle positivo, nessas idades, não observaram-se imunomarcações do parasito. A exceção foi com fêmeas de 19 dias de gestação e inóculo, que apresentaram imunomarcações para bradizoítas quando submetidas ou não ao tratamento.

Apesar dos resultados obtidos com fêmeas de 19 dias de gestação e inóculo, pode-se perceber que o tratamento tende a induzir a cronificação da infecção, promovendo a conversão precoce de taquizoítas em bradizoítas.

Fatores externos que causam estresse celular ao parasito podem causar danos ao DNA de *T. gondii* retardando o ciclo celular e inibindo sua replicação. Dessa forma, o parasito passa a se replicar de forma lenta, assumindo a forma de bradizoítas (GROSS et al., 2004). Possivelmente os fármacos atuam nos parasitos, inibindo a síntese de DNA e levando à transformação de taquizoítas em bradizoítas, durante a fase aguda da infecção.

A formação precoce de cistos também pode estar associada à alguma estratégia, do parasito, para se evadir do mecanismo de ação das drogas. Uma vez que, os cistos protegem os bradizoítas de fatores externos, como o sistema imunológico (DUBEY, 2004; SULLIVAN; HAKIMI, 2006).

Assim, pôde-se observar que os fármacos são eficientes para amenizar a possíveis danos fetais. Uma vez que, além de eliminar parte significativa de taquizoítas dos tecidos placentários, o tratamento com a associação ainda induz a cronificação da infecção. A conversão precoce de taquizoítas em bradizoítas é importante, pois taquizoíta é a forma invasiva do parasito e responsável pela transmissão congênita da toxoplasmose (BACHMEYER et al., 2006). Além disso, essa é a forma responsável pela fase aguda da doença, na qual ocorrem as lesões fetais (BOYER et al., 2005).

5. CONCLUSÕES

A análise dos dados aqui apresentados permite concluir que:

1. O tratamento com a associação de fármacos não causa alterações morfológicas na placenta de *Calomys callosus*.
2. A seqüência da infecção por *T. gondii*, nos compartimentos placentários, não é alterada mediante ao tratamento.
3. O tratamento mostrou-se eficaz à medida que diminuiu o número de taquizoítas na placenta de *C. callosus*. E pôde-se observar que quanto maior o tempo de tratamento menor a carga parasitária placentária.
4. O tratamento tenda a induzir a cronificação da infecção por *T. gondii*, com a conversão precoce de taquizoítas em bradizoítas mediante tratamento.
5. *C. callosus* é um bom modelo experimental para o estudo de eficácia do tratamento da toxoplasmose congênita.

Dessa forma, *C. callosus* é um bom modelo experimental para o estudo de toxoplasmose congênita, já que transmite a infecção ao feto apenas na fase aguda. E, também, para estudos relacionados à eficácia do tratamento dessa doença.

6. FIGURAS E GRÁFICOS

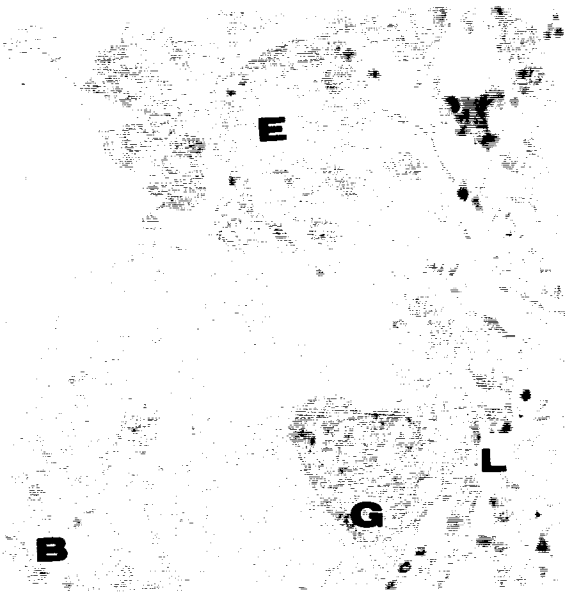


Gráfico 1

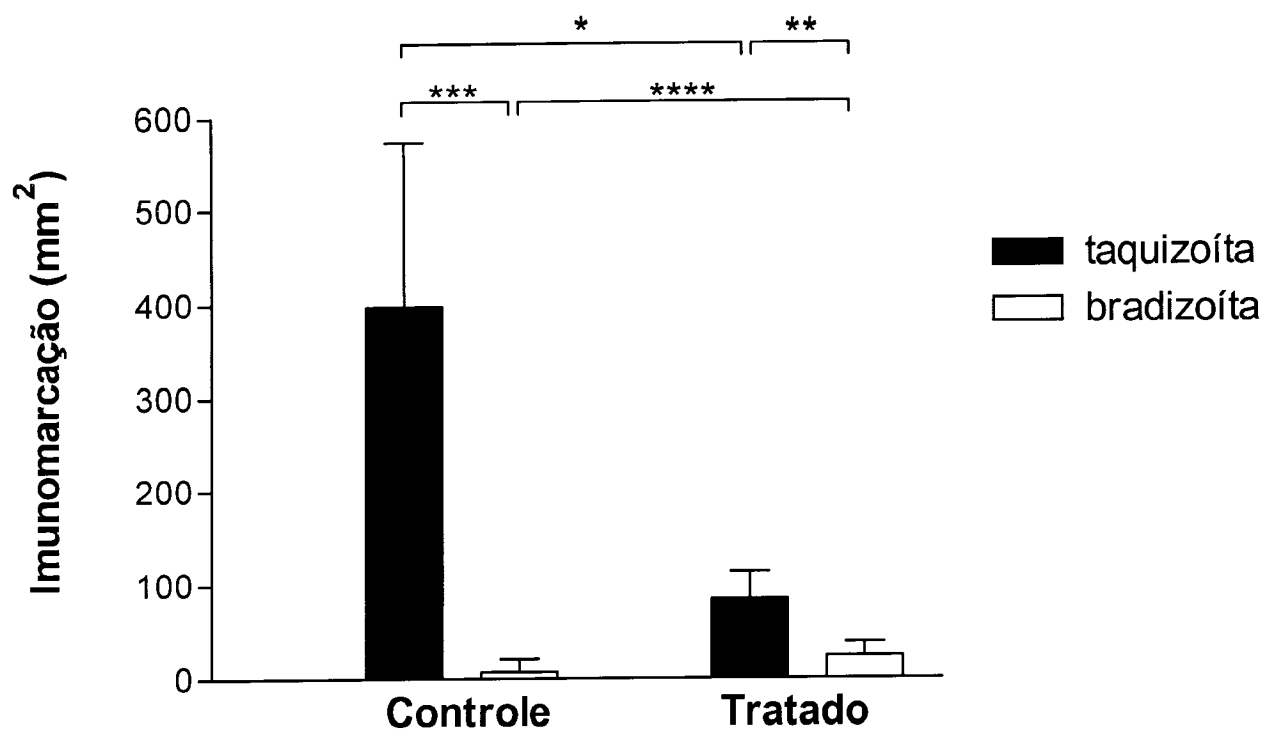


Gráfico 1: Número total de imunomarcações de taquizoítas e bradizoítas em animais controle ou tratados com a associação de fármacos. *P = 0,0240. **P = 0,0286. ***P = 0,0286. ****P = 0,0262.

GRÁFICO 2

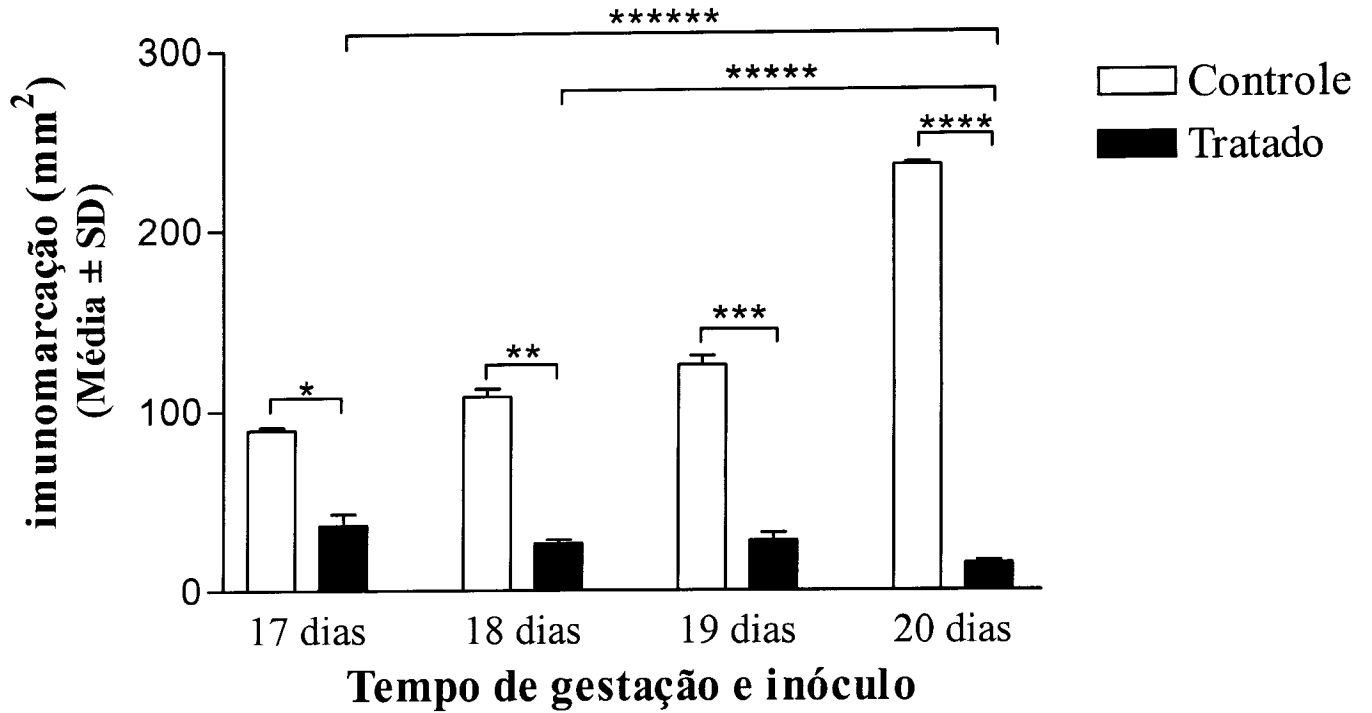


Gráfico 2: Média dos valores reais de imunomarcações de taquizoítas em animais controle ou tratados com a associação de fármacos, em diferentes idades gestacionais. *P = 0,0286. **P = 0,0286. ***P = 0,0286. ****P = 0,0200. *****P = 0,0286. *****P = 0,0252.

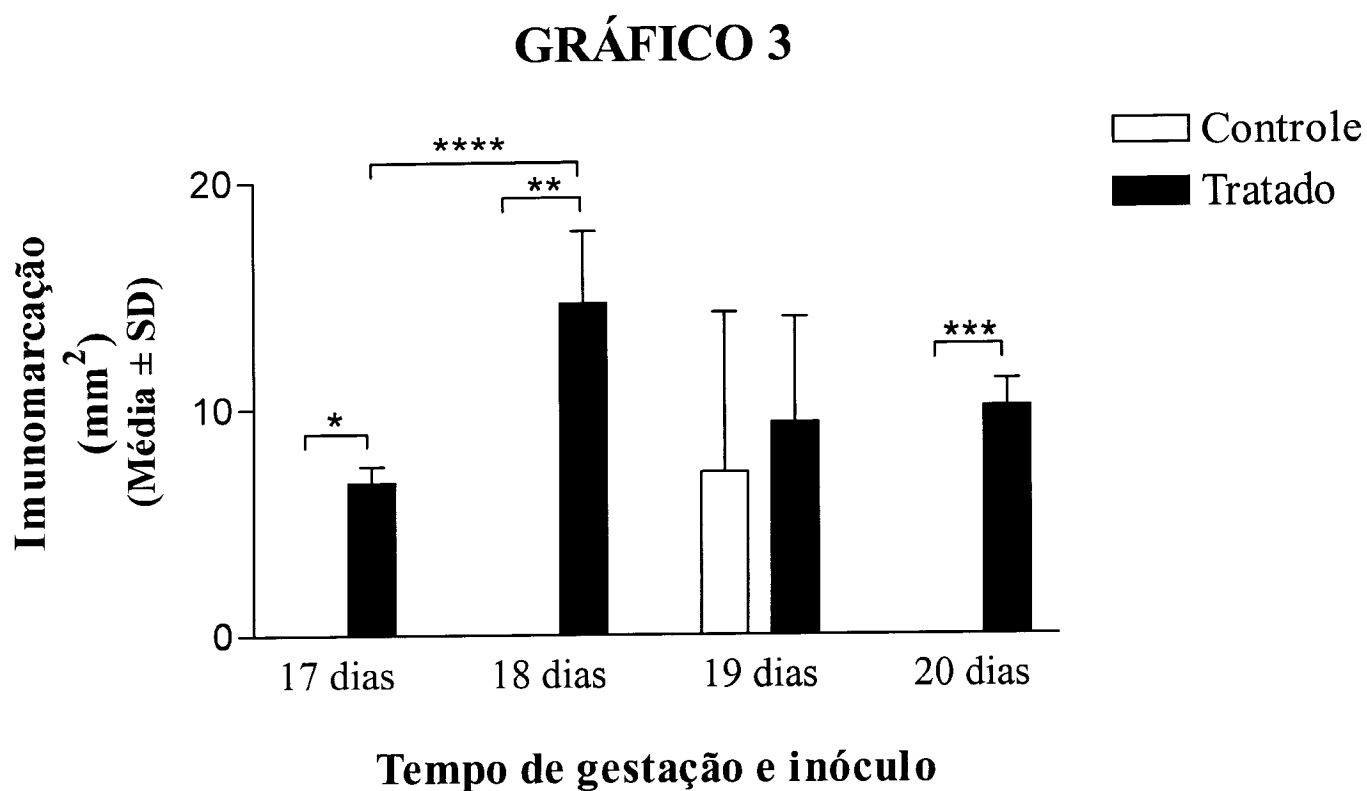


Gráfico 3: Média dos valores reais de imunomarcações de bradipoles em animais controle ou tratados com a associação de fármacos, em diferentes idades gestacionais. *P = 0,0286. **P = 0,0213. ***P = 0,0235. ****P = 0,0286.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AJZENBERG, D.; DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1940 – 1943, 2005.

ALLEGRA, C. J.; BOARMAN, D.; KOVACA, J. A.; MORRISON, P.; BEAVER, J.; CHABNER, B. A.; MASUR, H. Interaction of sulfonamide and sulfone compounds with *Toxoplasma gondii* dihydropteroate synthase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 371 – 379, 1990.

BACHMEYER, C.; MOUCHNINO, G.; THULLIEZ, P.; BLUM, L. Congenital toxoplasmosis from a HIV – infected woman as a result of reactivation. **Journal of Infection**, v.52, p. 55 – 57, 2006.

BRAZ, L. M. A.; DI PIETRO, A. O.; NETO, V. A.; FRANÇA, F. O. S. Avaliação da eficácia da azitromicina e da pirimetamina, usadas isolada ou associadamente, no tratamento de infecção experimental de camundongos pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 401 – 403, 1999.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 438 – 442, 2002.

BOYER, K. M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISHER, C.; MACK, D.; REMINGTON, J.; WITHERS, S.; MEIER, P.; MCLEOD, R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, n. 2, p. 564 – 571, 2005

* Elaborada segundo SILVA, A. M.; PINHEIRO, M. S. F. & FREITAS, N. E. Guia para normalização de trabalhos Técnico-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 3ª Edição. Uberlândia: EDUFU, 165p., 2003.

CARLSON, B. M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 84 – 95, 1996.

CARRUTHERS, V. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 595 – 600, 2006.

CARRUTHERS, V. Host cell invasion by opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, p. 111 – 122, 2002.

CHEN, K. T.; ESKILD, A.; BRESNAHAN, M.; STRAY-PEDERSEN, B.; SHER, A.; JENUM, P. A. Previous maternal infection with *Toxoplasma gondii* and the risk of fetal death. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 193, p. 443 – 449, 2005.

CROY, B. A.; GUILBERT, L. J.; BROWNE, M. A.; GOUGH, N. M.; STINCHCO, M. B.; WEGMANN, T. G. Characterization of cytochine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. **J. Reprod. Immunol.**, v. 49, n. 1, p. 149 – 166, 1991.

DANTAS-LEITE, L.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. Antiproliferative synergism of azasterols and antifolates against *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 2, p. 130 – 135, 2005.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; MILENKOVIC, V.; NIKOLIC, A.; BOBIC, B.; GRUJIC, J. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a cystogenic (ME49) strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 981 – 987, 2002.

DUNAY, I. R.; HEIMESSAT, M. M.; BUSHRAB, F. N.; MULLER, R. H.; STOCKER, H.; ARASTEH, K.; KUROWSKI, M.; FITZNER, R.; BORNER, K.; LIESENFELD, O. Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a murine model of reactivated toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4848 – 4854, 2004.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1 – 2, p. 52 – 72, 2004.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animal and Man**, 1. ed. Flórida: CRC Press, INC, 1988.

EATON, M. S.; WEISS, L. M.; KIM, K. Cyclic nucleotide kinases and tachyzoite-bradyzoite transition in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 107 – 114, 2006.

FARHAT, C. K.; CARVALHO, E. S.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. **Infectologia Pediátrica**. 2^a ed. São Paulo: Atheneu, p. 612 – 618, 1998.

FAVORETO-JUNIOR, S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. O. A.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (RODENTIA, CRICETIDAE) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 103 – 107, 1998.

FERGUSON, D. J. P. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 347 – 360, 2004.

FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, A. B.; RIBEIRO, M. F. B.; TAFURI, W. L.; VITOR, R. W. A. *Toxoplasma gondii*: In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy – (1-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 125 – 129, 2006.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto – Imunes**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 278 – 286, 2001.

FERREIRA, G. L. S.; MINEO, J. R.; OLIVEIRA, J. G.; FERRO, E. A. V.; SOUZA, M. A.; SANTOS, A. A. D. *Toxoplasma gondii* and mast cells interactions in vivo and in vitro: experimental infection approaches in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Microbes and Infection**, v. 6, p. 172 – 181, 2004.

FERREIRA, A. P.; TEIXEIRA, H. C. **Tópicos de Imunologia Básica**. 1ª ed. Juiz de Fora: ISBN, 83 p., 2005.

FERRO, E. A. V.; SILVA, D. A. O.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7089 – 7094, 2002.

FERRO, E. A. V. **Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus***. Tese (Doutorado) apresentada no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2000.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MORTARA, R. A.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitology Research**, v. 85, p. 647 – 654, 1999.

FERRO, E. A. V. **Estudo da interface materno-embrionária em etapas iniciais da implantação em *Calomys callosus***. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1991.

FLÓREZ, J.; ARMIJO, J. A.; ÁFRICA, M. **Farmacologia Humana**, 4. ed. Barcelona (Espanha): Masson, 2003.

GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Ann. Inst. Super Sanità**, v. 40, n. 1, p. 67 – 70, 2004.

GRUJIC, J.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; NOKOLIC, A.; KLUN, I.; BOBIC, B. Effectiveness of spiramucin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 226 – 230, 2005.

HAJJ, H. E.; LEBRUN, M.; FOURMAUX, M. N.; VIAL, H.; DUBREMETZ, J. F. Characterization, biosynthesis and fate of ROP7, a ROP2 related rhoptry protein of *Toxoplasma gondii*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 146, p. 98 – 100, 2006.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634 – 640, 2002.

JOLLIE, W. P. Fine structural changes in the junctional zone of the rat placenta with increasing gestational age. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 12, n. 4, p. 420 – 438, 1965.

JONES, J.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. **American Family Physician**, v. 67, n. 10, p. 2131 – 2138, 2003.

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, 2001.

KATZUNG, B. C. **Farmacologia Básica & Clínica**, 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 546 – 550, 1998.

KATZUNG, B. C. **Farmacologia Básica & Clínica**, 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 546 – 554, 2006.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, v. 118, p. 212 – 216, 2005.

LARSEN, W. J. **Human Embryology**. New York (USA): Churchill Livingstone, p. 435 – 447, 1993.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**, 7^a ed. São Paulo: Artmed, p. 72 – 85, 2005.

MCLEOD, R.; MACK, D.; BROWN, C. *Toxoplasma gondii* – New advances in cellular and molecular biology. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 109 – 121, 1991.

MELLO, D. A. Biology of *Calomys callosus* (RENGGER, 1830) under laboratory conditions (Rodentia, Cricetidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 4, p. 807 – 811, 1978.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 12, p. 1965 – 1975, 2004.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 10^a ed. São Paulo: Atheneu, p. 147-156, 2002.

PASSOS, L. N.; ARAÚJO-FILHO, O. F.; ANDRADE-Jr, H. F. *Toxoplasma* encephalites in AIDS patients in São Paulo during 1998 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 3, p. 141 – 145, 2000.

PEREIRA, M. F. **Toxoplasmose Ocular Experimental Congênita e Adquirida em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)**. Tese (Mestrado) apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologias Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, 1998.

PESSÔA, S. B. **Parasitologia Médica**, 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 277 – 296, 1977.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**, 5^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 724 – 726, 2004.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 941 – 945, 2004.

REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 5^a ed. Palo Alto: W.B. Saunders Company. p. 205 – 320, 2001.

REY, L. **Parasitologia**, 2^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 6^a ed. São Paulo: Manole, 2003.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458 - 472, 2005.

RUGH, R. **The Mouse – Reproduction and Development**. Mineapolis, Minn.: Burgess Publishing Company, p. 88 – 101, 1967.

SAEJI, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with infected host. **Trends in Parasitology**, v. 10, p. 476 – 481, 2005.

SCHMIDT, D. R.; HOGH, B.; ANDERSEN, O.; HANSEN, S. H.; DALHOFL, K.; PETERSEN, E. Treatment of infants with congenital toxoplasmosis: tolerability and plasma concentrations of sulfadiazine and pyrimethamine. **Eur. J. Pediatr.**, v. 165, n. 1, p. 19 – 25, 2006.

- SIBLEY, L. D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. **Science**, v. 304, p. 248 – 253, 2004.
- SILVA, P. **Farmacologia**, 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.
- SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; CAMILO-COURA, L. Estudo Prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 1 – 14, 2003.
- SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 3, p. 137 – 142, 2006.
- SULLIVAN, W. J.; HAKIMI, M. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 148, n. 2, p. 109 – 116, 2006.
- SUZUKI, Y.; CONLEY, F.K.; REMINGTON, J.S. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 790 – 794, 1989.
- TAKATA, K.; FUJIKURA, K.; SHIN, B. C. Ultrastructure of rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. **J. Rep. Development**, v. 43, n. 1, p. 1 – 17, 1997.
- VILLENA, I.; MARLE, M.; DARDÈ, M.; PINON, J.; AUBERT, D. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 160 – 162, 2004.
- ZUCKERMAN, F. A.; HEAD, J. R. Isolation and characterization of trophoblast from murine placenta. **Placenta**, v. 7, n. 4, p. 349 – 364, 1986.