

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Eficácia do tratamento da Azitromicina na transmissão
congenita de *Toxoplasma gondii* em *Calomys callosus***

Carla Duque Lopes

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
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Eficácia do tratamento da Azitromicina na transmissão
congenita de *Toxoplasma gondii* em *Calomys callosus***

Carla Duque Lopes

Janethe Deolina de Oliveira Pena (Orientadora)

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
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Eficácia do tratamento da Azitromicina na transmissão
congenita de *Toxoplasma gondii* em *Calomys callosus***

Carla Duque Lopes

Janethe Deolina de Oliveira Pena (Orientadora)

Instituto de Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em / /


Profa. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

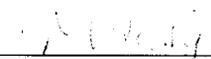
**Eficácia no tratamento da Azitromicina na transmissão
congenita de *Toxoplasma gondii* em *Calomys callosus***

Carla Duque Lopes

Aprovado pela Banca examinadora em: __/__/__ Nota: __



Janethe Deolina de Oliveira Pena
(Orientadora)



Profa. Dra. Neide Maria da Silva



Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia, __ de _____ de _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que, de longe, caminharam comigo com grande compreensão e amor;

A minha irmã de coração, Ana Paula, pelo dia-a-dia, pelo companheirismo, por me ajudar tanto nessa vida corrida e fazer do lar um cantinho tão alegre e gostoso de voltar;

Ao meu companheiro, Heitor, pela imensa paciência, por estar do meu lado todas as vezes que mais precisei e pela retribuição de tamanho amor;

À dedicação dos amigos de laboratório, Richard e Hélió, por fazer o tempo transcorrer mais leve e com boas risadas nas duras bancadas;

A orientação da Janethe e à oportunidade de exercer e abraçar a profissão que tanto gosto;

A todos aqueles que caminharam e caminham comigo nessa jornada, acrescentando, a cada amanhecer, um novo aprendizado.

E finalmente ao CNPq pelo apoio financeiro com a bolsa da Iniciação Científica.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros. Quando transmitidos durante a gestação, as conseqüências para o feto são geralmente graves, especialmente no sistema nervoso central, onde ocorre inflamação e necrose, deixando lesões irreversíveis. A droga mais utilizada no tratamento da toxoplasmose durante a gestação é a espiramicina, que tem diversos efeitos colaterais. O propósito deste estudo foi testar se o macrolídeo azitromicina era capaz de reduzir a transmissão placentária de *T. gondii* em modelo experimental no roedor *Calomys callosus*. Fêmeas de *C. callosus* foram inoculadas por via oral com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* no dia da fertilização, determinado pela presença da rolha vaginal. Fetos e placentas foram coletados do 15º ao 20º dia de gestação, sendo que cérebro e olhos foram fixados em formalina e embebidos em parafina para análise imunohistoquímica usando anticorpo monoclonal contra TgSAG1. O cérebro e o fígado, assim como a placenta, foram macerados e inoculados intraperitonealmente em camundongos Swiss para análise sorológica. No grupo controle, *Toxoplasma* foi detectado em todos os cortes de cérebro e em cortes oculares dos dias gestacionais 17 e 19, enquanto que no grupo tratado com azitromicina, só houve detecção de taquizoítas em cortes de cérebro do dia gestacional 16, sendo todos os cortes oculares negativos para a presença do parasita. No modelo estudado, o tratamento de fêmeas grávidas com azitromicina diminuiu a transmissão congênita de *T. gondii*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Apresentação e Epidemiologia	1
Ciclo de Vida	1
Meios de Infecção	2
Grupos de Risco	3
Quebra de Barreiras Imunológicas	4
Infecção congênita	5
Cepas do toxoplasma	6
Toxoplasmose ocular	6
Infecção encefálica	7
Tratamento	8
Fármacos no combate à toxoplasmose	8
Azitromicina	8
<i>Calomys callosus</i>	9
MATERIAL E MÉTODOS	11
Manutenção dos <i>Calomys callosus</i>	11
Manutenção da Cepa ME-49	11
Grupos experimentais	11
Ensaio Imunohistoquímicos	12
Detecção do <i>T. gondii</i> em placentas e tecidos embrionários	12
Ensaio Imunoenzimático - ELISA	13
RESULTADOS	14
Ensaio sorológico e bioensaio	14
Ensaio imunohistoquímico	15
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

INTRODUÇÃO

Apresentação e Epidemiologia

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório. Primeiramente descrito em (1908) por Nicolle e Manceaux, no norte da África e por Splendore no Brasil. Esse parasita é habilmente capaz de infectar e replicar em qualquer tipo celular nucleado de mamíferos e aves (BLACK; BOOTHROYD, 2000; NEVES, 2003). Possui uma larga distribuição geográfica sendo mais comumente encontrado nos trópicos. Recentemente vem conquistando a atenção de pesquisadores por ser um importante patógeno oportunista para os seres humanos e outros animais (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998; CARRUTHRES, 2002).

Em humanos a toxoplasmose atinge cerca de 10 a 30% da população mundial: 58% nos países da Europa Central, 51- 72% na maioria dos países da América do Sul e 54- 77% nos países do Oeste da África (RORMAN et al., 2006). No Brasil, a média de infecção é de 40-80% (GOMES et al., 1975; NEVES, 2003).

A prevalência de anticorpos específicos para *T. gondii* é diretamente proporcional a idade (RORMAN et al., 2006). Dados mostrados por Francisco et al. (2006), indicam um alto índice de soroprevalência (56%) entre adolescentes de 13 a 15 anos contra 5,8% de crianças entre 1 a 3 anos de idade. Todos moradores da mesma comunidade paulistana.

Dentre as pessoas contaminadas no mundo, estima-se que aproximadamente, 20% da população estão infectadas cronicamente (BARRAGAN; SIBLEY, 2003). Entretanto esses dados podem ter valores maiores. Sua expressividade chega a terceira mais comum causa de morte por ingestão de alimentos contaminados nos Estados Unidos (CARRUTHRES, 2002).

Ciclo de Vida

O ciclo de vida de *T. gondii* consiste de dois estágios - assexuado e sexuado. O estágio assexuado ocorre nos hospedeiros intermediários, no qual estão incluídos mamíferos e aves. Nesta fase o parasita é denominado de taquizoíta cuja forma oval ou crescente é capaz de infectar, praticamente, qualquer célula nucleada de mamífero ou de aves. À penetração ativa na célula formam um vacúolo parasitóforo no qual multiplicam com rapidez, cerca de 6 a 8

horas *in vitro*. Após grande replicação, o parasita alcança a corrente sanguínea e se espalha pelo organismo, desenvolvendo, assim, a fase aguda da doença (parasitemia). A resposta imune e a transformação dos taquizoítas em bradizoítas limitam o estágio agudo e, então, estabiliza-se a fase crônica. Os bradizoítas são encontrados em cistos bem definidos e diferenciam-se dos taquizoítas principalmente por sua lenta taxa de multiplicação e por algumas proteínas específicas expressas na superfície. Os cistos são formados principalmente nos tecidos neurais e musculares, especialmente no cérebro e nos músculos estriados esqueléticos e cardíacos. Alcançam também a retina e a placenta e podem permanecer inativos nos organismos por longos períodos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

O estágio sexual ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos – os felídeos, predominantemente os gatos domésticos. Quando bradizoítas ou oocistos são ingeridos por um felino, estes se alojam no epitélio intestinal. Milhares de oocistos não esporulados são liberados nas fezes de um único gato no período de 3 -18 dias, dependendo do estágio do *Toxoplasma* que foi ingerido. Sob condições ambientais favoráveis, os oocistos esporulam dentro de 3 semanas. Esses podem espalhar pelo ambiente contaminando as águas, solos, frutas, verduras e herbívoros pelo consumo de plantas contaminadas. Os oocistos são muito estáveis em ambientes úmidos e quentes e são resistentes a muitos agentes desinfetantes, mas sobrevivem pouco em ambientes áridos ou em regiões frias (DUBLEY, 2001; NEVES, 2003; RORMAN et al., 2006).

Meios de Infecção

As infecções humanas ocorrem de modo acidental por meio da ingestão de carnes cruas ou mal passadas que contenham cistos, pela ingestão de água ou comidas contaminadas com oocistos, através da transmissão placentária quando a mãe adquire a infecção durante a gestação (DEGERLI et al., 2003) ou através do leite materno caso a mãe tenha adquirido toxoplasmose recentemente (DUBLEY, 1998) (Figura 1).

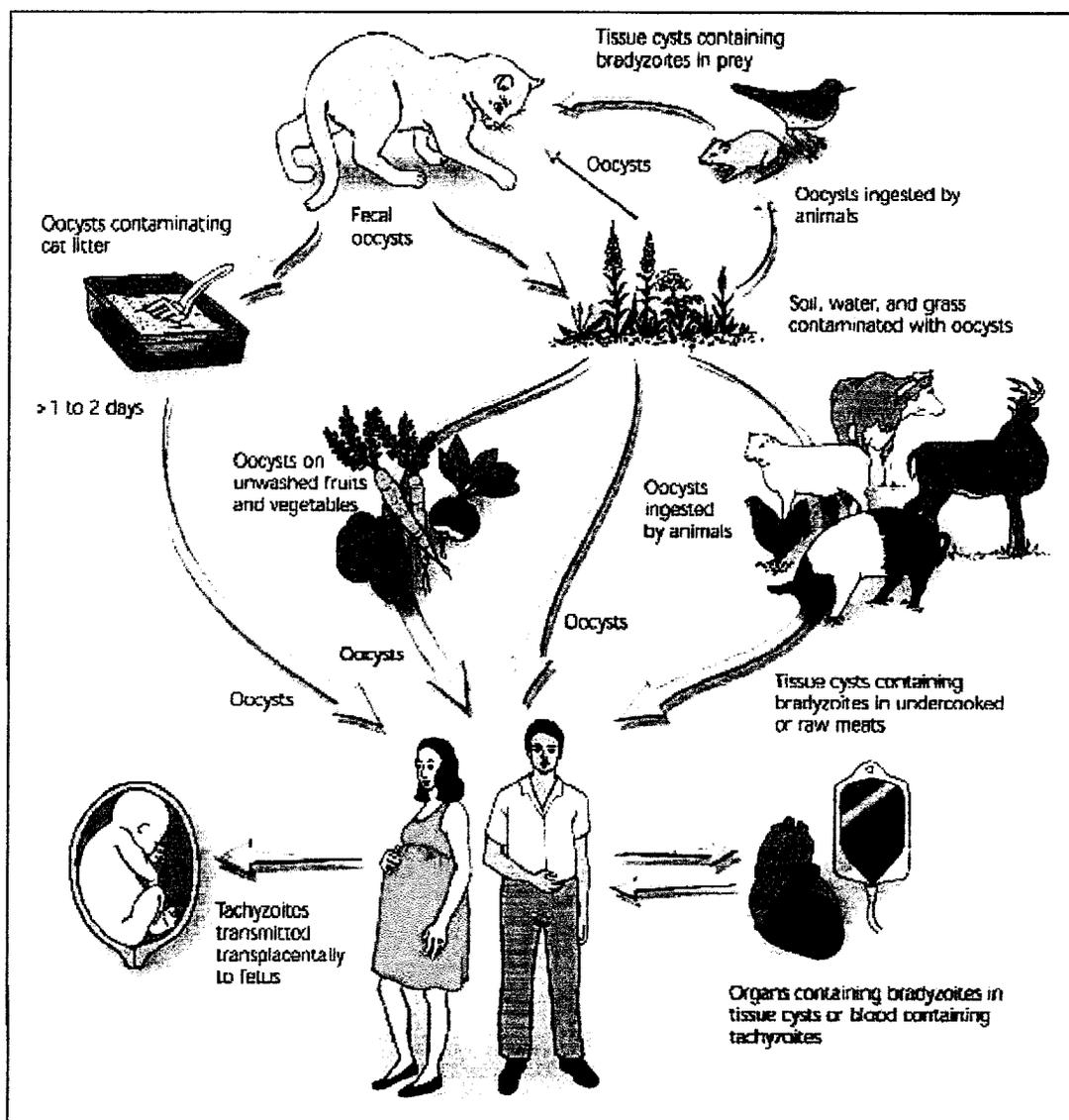


Figura 1: Vias da infecção por *Toxoplasma gondii*. Figura adaptada de Jones et al. (2003).

Grupos de Risco

A toxoplasmose é, em geral, assintomática em indivíduos imunocompetentes. As infecções fatais acontecem dentro de duas circunstâncias principais: através da transmissão congênita ou por meio de reativações da infecção latente durante disfunções imunes. Nesse último grupo, as reativações ocorrem em indivíduos imunodeprimidos moderados ou graves. Tratamento com terapias imunossupressoras, como por exemplo, em pacientes transplantados e neoplásicos deixam-os vulneráveis à reativação ou à infecção primária sintomática por toxoplasmose (CARRUTHRES, 2002).

Outro conjunto importante de indivíduos imunocomprometidos são os pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) entre os quais *Toxoplasma gondii* é um dos patógenos mais freqüentes (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Isso é reforçado por dados que demonstram que a toxoplasmose tem emergido nas duas últimas décadas como uma das mais comuns infecções oportunistas associadas à AIDS (CARRUTHRES, 2002). A toxoplasmose é a causa recorrente de lesões focais intracerebrais resultando em encefalites. Embora já haja no mercado terapias que combatam a doença, tais tratamentos não eliminam o estágio de bradizoíto encontrado na fase crônica. Se descoberto tardiamente, a encefalite toxoplásmica pode ser fatal (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Quebra de Barreiras Imunológicas

Durante as infecções naturais orais, *Toxoplasma* é capaz de cruzar o epitélio intestinal, disseminar-se por tecidos mais profundos e atravessar barreiras biológicas como placentas, barreiras hemato-encefálicas e a hemato-retiniana a fim de alcançar sítios de imunoprivilégio. São nesses locais onde o parasita causa as patologias mais graves (BARAGAN; SIBLEY, 2002).

As barreiras do sistema nervoso central são formadas pelos endotélios dos capilares cerebrais e da retina. Essas células endoteliais são interconectadas por junções intercelulares com grande resistência intracelular (acima de $1000\Omega/\text{cm}^2$). A interação que ocorre entre as células gliais (astrócitos, células de Müller, pericitos) e células endoteliais regulam a permeabilidade da barreira, uma fina camada de material é secretada, rica em glicoproteínas e glicosaminoglicanas, denominada lâmina basal que se interpõe entre as membranas celulares e os contatos medianos das células.

Para infectar o feto em desenvolvimento, *Toxoplasma* deve cruzar a interface materno-fetal, definida por uma superfície vilosa da placenta que separa a circulação fetal da materna. Camadas de células epiteliais totipotentes, sinciciotrofoblasto, e citotrofoblasto definem a seletividade funcional da barreira placentária (BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

A infecção sistêmica ocorre quando o parasita cruza o epitélio intestinal, a membrana basal e a lâmina própria. A barreira intrínseca do intestino é composta de células epiteliais no tubo digestivo e de junções que as mantêm firmemente unidas. A barreira extrínseca consiste de secreções e influências externas que afetam as células epiteliais e mantêm a função da barreira, tais como a secreção de imunoglobulina A secretora (DUBLEY, 1998).

A quebra dessas barreiras do hospedeiro é um requisito para levar a disseminação e o estabelecimento da infecção por *Toxoplasma gondii*. Recentemente descobriu-se que *Toxoplasma* é capaz de cruzar monocamadas de células polarizadas.

A capacidade de cruzar as barreiras epiteliais rapidamente e alcançar os vasos sanguíneos dentro de horas após a infecção é um importante componente da disseminação *in vivo*, particularmente em sítios de imunoprivilégio tais como o sistema nervoso central e a placenta (BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

Infecção congênita

A toxoplasmose congênita é uma das principais síndromes clínicas causada pelo parasita. Quando a infecção primária ocorre durante a gestação, os taquizoítas atravessam a barreira placentária atingindo diversos tecidos fetais levando às complicações que podem ser fatais (DEGERLI, 2003). Segundo estudos de Barragan e Sibley (2003), a barreira é ativamente quebrada por migrações do parasita.

A gravidade das infecções congênicas depende da idade gestacional quando a infecção primária ocorre. Em fetos humanos, a doença está associada com graves distúrbios congênicos quando a aquisição acontece no primeiro trimestre da gestação (FERRO et al., 1999), podendo desencadear abortos espontâneos, distúrbios neurais tais como cegueira, coriorretinites, calcificações do tecido cerebral, hidrocefalia, retardo mental e psicomotor, sendo alguns desses sinais conhecidos como “Tétrade de Sabin” (DEGERLI, 2003; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Quando a infecção é adquirida no primeiro trimestre de gestação, a transmissão é pequena e tende a aumentar com o avançar da gestação. Entretanto os danos ao feto são inversamente proporcionais, sendo mais graves durante o primeiro trimestre de vida intrauterina. Dessa maneira, o terceiro trimestre é o mais propício para a passagem do *Toxoplasma*, com probabilidade de cerca de 60% (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Em geral, os sintomas clínicos serão perceptíveis meses ou anos após o nascimento. Indivíduos com toxoplasmose congênita não tratada durante o primeiro ano de vida são normalmente susceptíveis a seqüelas graves como distúrbios oculares e encefálicos podendo manifestar-se tanto na idade infantil como na adulta (DJURKOVIC-DJAKOVIC et al., 2005).

Cepas de *Toxoplasma*

Estudos de genética de população demonstram que as cepas de *T. gondii* pertencem a três linhagens clonais (DJURKOVIC-DJAKOVIC et al., 2006). A grande parte das cepas isoladas da Europa e Norte da América são classificadas em 3 grandes grupos (I, II, III) os quais diferenciam-se pela virulência e pelo padrão epidemiológico de ocorrência no hospedeiro. A maioria das cepas isoladas em indivíduos com AIDS são do tipo II. Os tipos I e II são recorrentes em pacientes com doenças congênitas. As cepas mais isoladas em animais são, em sua maioria do tipo III. A determinação numérica corresponde ao nível de virulência parasitária. A cepa ME-49 pertence ao tipo II é preferencialmente cistogênica.

Recentemente foram descritas cepas “exóticas” de *T. gondii*, prevalentes particularmente na América do Sul. Tais cepas acometem indivíduos sem histórico de imunossupressão ou de toxoplasmose congênita. Os sintomas estão relacionados a complicações pulmonares, esplenomegalia e alta incidência de lesões oculares (JONES et al., 2006).

Toxoplasmose ocular

As manifestações da toxoplasmose ocular são mais comuns como consequência de infecções congênitas (JONES et al., 2006). A toxoplasmose ocular de origem congênita em recém-nascidos foi descrita primeiramente em 1923, enquanto a infecção ocular em adultos foi reconhecida somente em 1952. Os conhecimentos sobre a doença desenvolveram-se rapidamente nos últimos cinquenta anos. Entretanto, muitos casos de infecção ocular em adultos são de difícil identificação quanto à origem da doença podendo desenvolver-se por uma reativação da infecção congênita que passou despercebida ou por uma infecção adquirida no período pós-natal.

A toxoplasmose ocular pode ser uma doença progressiva e recorrente que ameaça a acuidade visual. Quando de origem congênita, a retinocoroidite desenvolve-se gradualmente em semanas ou anos como uma forma subclínica. Esta se apresenta, frequentemente, bilateral com manchas esbranquiçadas ou escuras. A toxoplasmose adquirida em crianças mais velhas ou em adultos raramente progride para a retinocoroidite que é, em geral, uniocular (RUSSO et al., 2005).

No final da década passada, a retinocoroidite toxoplásmica foi considerada a infecção mais comum da retina e a causa maior de uveítes. Nesses dados estão inclusos pacientes

imunocomprometidos bem como casos de transmissão congênita. As reações inflamatórias e as seqüelas em pacientes com retinocoroidite são mais graves e recorrentes nos indivíduos provenientes da América do Sul do que os da América do Norte e os da Europa. Estudos de variabilidade genética apontam que a severidade da doença está interligada com a predominância da virulência do parasita e que esta pode interferir, inclusive, na resposta ao tratamento. No Brasil, as cepas do tipo I são predominantes entre humanos e aves (HOLLAND, 2004; VALLOCHI et al., 2005).

Diante da gravidade da infecção congênita, testes pré-natais para a detecção do “status” imunológico quanto ao *Toxoplasma* são realizados com o objetivo de identificar mulheres que adquiriram a infecção durante a gestação, especialmente durante o primeiro trimestre. As mães infectadas são tratadas com a finalidade de prevenir a infecção fetal e, se caso a transmissão ocorra, de diminuir o risco de danos intracranianos e oculares.

Como na França e na Áustria, o Brasil possui regiões com altas prevalências de infecção por *Toxoplasma*. Em Uberlândia, a transmissão congênita chega a 0,5% (SEGUNDO et al., 2004). Estudos recentes na Dinamarca demonstram uma taxa de infecção congênita de 2,1 nascidos em cada 10.000 crianças nascidas. Das 57 crianças com toxoplasmose confirmada, analisadas ao nascer, 12 apresentavam sinais clínicos no primeiro exame das quais 7 possuíam lesões retinocoroidais. Logo após o nascimento, 94 crianças tiveram os olhos examinados e 9 crianças possuíam lesões centrais na retinocoróide, duas com lesões maculares em ambos os olhos e 5 com lesões maculares em apenas um olho. Após um ano, 10 de 68 crianças tinham lesões centrais e com 3 anos de idade, 5 de 32 crianças tiveram tais lesões (SCHIMIDT, 2006).

Infecção encefálica

Alguns dos sítios de maior incidência de doença por *T. gondii* são o cérebro e a retina. A partir da década de 80, muitos casos de toxoplasmose foram notificados principalmente em indivíduos imunodeprimidos, especialmente em portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida. Nessas circunstâncias, a toxoplasmose é consequência da reativação do parasita latente. A encefalite toxoplásmica é a manifestação mais comum e, se não tratada, pode ocasionar graves lesões cerebrais e mesmo ser fatal (LESCANO et al., 2004).

Azitromicina

A azitromicina, um macrolídeo derivado da eritromicina é um potente inibidor da síntese protéica bacteriana o qual vem demonstrando resultados otimistas contra a toxoplasmose (BLAIS et al., 1993). A azitromicina liga-se à subunidade 70S do ribossomo e

atua tanto sobre taquizoítas quanto bradizoítas de *T. gondii*, portanto, em todos os estágios infectantes do parasita. Em sua distribuição subcelular, o fármaco acumula-se nas organelas acidificadas dos parasitas e nas células hospedeiras. Não há presença da droga nos vacúolos parasitóforos, uma vez que não possuem características ácidas (SCHWAB et al., 1994). Além disso, não apresenta efeito tóxico sobre o fígado.

Estudos *in vitro* da replicação do apicoplasto, o DNA circular de 35 Kb o qual se encontra na região apical do núcleo do *Toxoplasma gondii*, demonstra que a azitromicina é capaz de impedir, indiretamente, a replicação do parasita. Devido a sua atuação na síntese protéica, a sensibilidade ao medicamento é demonstrada quando há diminuição da multiplicação parasitária (FISCHEIRA; ROOS, 1997). Estudos em camundongos Balb/c descreveram resultados satisfatórios da azitromicina quando utilizada no tratamento da toxoplasmose adquirida (DERGELI et al., 2003).

A azitromicina é bastante empregada na terapêutica médica quando ocorre grave neutropenia em paciente utilizando a associação de sulfadiazina e pirimetamina, ou nos casos de alergia a essas drogas.

Calomys callosus

Modelos experimentais para a toxoplasmose congênita têm sido descritos na literatura desde o início da década de 50 (FERRO, 1999). Dentre eles, o *Calomys callosus*, um cricetídeo de ampla distribuição no território nacional, tem demonstrado uma grande susceptibilidade à várias doenças parasitárias e infecciosas incluindo a toxoplasmose (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998; FERRO et al., 2002).

Estudos relacionando o *C. callosus* ao *Toxoplasma* evidenciaram que o animal apresenta uma elevada susceptibilidade quando infectado pela cepa RH de *T. gondii* ocorrendo óbito no oitavo dia de infecção (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998). Isso é decorrente da infecção de células trofoblásticas tão logo iniciado o processo de implantação embrionária. Entretanto, os dados descritos revelaram que o uso da cepa ME-49 de *T. gondii* desenvolve uma cinética de infecção em diferentes compartimentos da placenta e definiu-se que a transmissão congênita só ocorreria durante a fase aguda da doença, semelhante ao que ocorre na espécie humana (FERRO et al., 2002). Recentemente foi identificado que a passagem transplacentária do parasita acontece somente no intervalo de 10 dias antes da pré-concepção, ou seja, durante a fase aguda materna. Em contrapartida, o aparecimento do

tampão vaginal, 30 ou 50 dias após a inoculação parasitária, indica ausência de infecção fetal, fato justificável pela cronicidade materna da doença (BARBOSA et al., 2006).

Diante da severidade dos sintomas e morbidade da toxoplasmose congênita, faz com que novas metodologias para o estudo biológico bem como ao uso de tratamentos e suas conseqüências sejam intensamente investigados.

Este trabalho, portanto, objetivou determinar a incidência de lesões oculares e cerebrais nos fetos de fêmeas de *C. callosus* infectadas com *T. gondii* e tratadas com azitromicina ou veículo durante o período pré-natal.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção dos *Calomys callosus*

Os animais da linhagem Canabrava provenientes do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo foram mantidos no biotério do Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob condições de 10 horas de escuro e 14 horas de claro em temperatura controlada (25 ± 2 °C) com água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Manutenção da Cepa ME-49

A cepa ME-49 foi mantida em encéfalo de *C. callosus* machos através da inoculação de 20 cistos de *T. gondii* em 0,5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2 estéril, via oral, por meio de cânula intragástrica. Após um período de 30 a 45 dias estes animais foram sacrificados, seus cérebros macerados e banhados com 1mL de PBS. Com o auxílio de seringa de 5ml e, posteriormente, de agulha de 25x7mm, o órgão foi homogeneizado por aspiração. O material foi, então, ressuspenso em 10mL de PBS estéril submetido à centrifugação a 500g por 10 minutos, em temperatura ambiente, por duas vezes. Após as lavagens, uma alíquota de 20 μ L da suspensão foi observada em microscópio óptico no aumento de 10x para contagem de cistos. Posteriormente, 500 μ L de suspensão de 20 cistos/mL em PBS foi administrada.

Grupos experimentais

Doze fêmeas virgens de *Calomys callosus* com 2 a 3 meses de idade foram divididas em 2 grupos de 6 animais e subdivididas em estágios gestacionais variando do 15° ao 20° dias de gestação. As fêmeas virgens foram acasaladas na razão de duas fêmeas para um macho e o dia do aparecimento do tampão vaginal foi contado como o primeiro dia de gestação.

Ambos os grupos foram infectados por via oral com 20 cistos de *T. gondii* da cepa ME-49 no primeiro dia de gestação. No quarto dia de gestação, foi administrado à um grupo

9mg de azitromicina em 500µl de PBS estéril uma vez ao dia. O grupo controle recebeu somente a mesma quantidade em volume de PBS estéril nas mesmas condições do grupo tratado.

Os animais foram eutanasiados do 15º ao 20º dia de gestação/ inóculo e placentas e embriões retirados para análises imunológicas para a detecção do parasita. Amostras de sangue das fêmeas foram coletadas via plexo orbital no primeiro dia de gestação e quando os animais foram eutanasiados para determinar os níveis de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma* por ensaios imunoenzimáticos.

Ensaio Imunohistoquímico

Para imunolocalização dos parasitas, foram coletadas as cabeças dos embriões, fixadas por imersão em 10% de formalina em 0,1M de tampão fosfato (pH 7,4), desidratadas e embebidas em parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram colocados sobre lâminas e secados a 60°C. Os tecidos foram incubados 30 minutos em temperatura ambiente com peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio de peroxidase endógena e então, incubada com uma solução de 2% de soro de cabra normal para bloquear sítios de ligação não específicos (20 minutos à temperatura ambiente). Em seguida, foram adicionados aos cortes 100µL de soro de camundongo anti- *Toxoplasma gondii* deixando reagir por cerca de 18h a 4°C. O anticorpo secundário (IgG de cabra anti-camundongo biotilado, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi colocado, permanecendo por 30 minutos à 37°C. A reação foi amplificada pelo complexo avidina-biotina (Sistema ABC, Biomed, Foster City, CA, USA) e revelada com H₂O₂ e 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Fast™). As amostras foram contracoradas com hematoxilina de Meyer e examinada em fotomicroscópio.

Detecção de *T. gondii* em placentas e tecidos embrionários

A detecção indireta do parasita foi realizada através de bioensaio seguindo as descrições de Grigg e Boothroyd, 2006 com algumas modificações.

Cérebro e fígado embrionários, bem como as placentas foram homogeneizados em PBS e separadamente inoculados intraperitonealmente em camundongos Swiss em duplicatas. O soro desses animais foi coletado após o 15º, 30º e 45º dias de inóculo com o material macerado.

Ensaio Imunoenzimático - ELISA

Placas de poliestireno de 96 poços (Interlab, São Paulo, Brasil) foram recobertas com uma solução de antígenos da cepa RH de *T. gondii* à concentração protéica de 10µL/mL em tampão carbonato de sódio (0,06M, pH 9,6) e permaneceram overnight à temperatura de 4°C. Os poços foram lavados três vezes com PBST (PBS mais 0,01% de Tween 20) e incubado com as amostras de soro de camundongo Swiss, em duplicata, diluído 1:16 em PBST. Seguido de uma incubação de 1 hora à 37°C e uma série de seis lavagens em PBST. Posteriormente, os poços foram incubados com o conjugado imunoenzimático IgG de cabra anti-camundongo marcado com peroxidase e incubado por uma hora a 37°C. A revelação foi realizada com peróxido de hidrogênio (0,04%) e o-phenylenedina (0,5mg/mL) diluído em tampão fosfato-citrato (0,1M, pH 5,0). A reação foi interrompida com 2N de NH₂SO₄ e a leitura óptica mensurada à 492nm. Os resultados foram expressos em Índice Elisa (EI) como segue: $EI = OD \text{ amostra} / \textit{cut-off}$, onde o *cut-off* foi estabelecido como a média dos valores de OD dos soros dos controles negativos mais três desvios padrões. Baseado nos resultados entre os soros de controles negativos e controles positivos, os valores do $EI > 1,2$ foram considerados positivos.

RESULTADOS

Ensaio sorológico e bioensaio

Todas as fêmeas virgens, no dia da rolha vaginal apresentavam sorologia negativa para *T. gondii* e positiva no dia da eutanásia (dados não mostrados).

Nos dados de identificação indireta do parasita, camundongos Swiss foram inoculados intraperitonealmente com macerados de encéfalo e fígado embrionário e com a placenta, separadamente, e os soros obtidos analisados pelo método ELISA. No grupo tratado com azitromicina houve igual número de ensaios positivos ao *T. gondii* nas placentas comparadas ao grupo controle. Entretanto, quando inoculados cérebro e fígado embrionários, houve positividade somente nos embriões coletados no 17º e 19º dias de gestação, enquanto no grupo controle houve positividade quando inculados tecidos de embriões coletados do 15º e 18º dias de gestação (Figura 2).

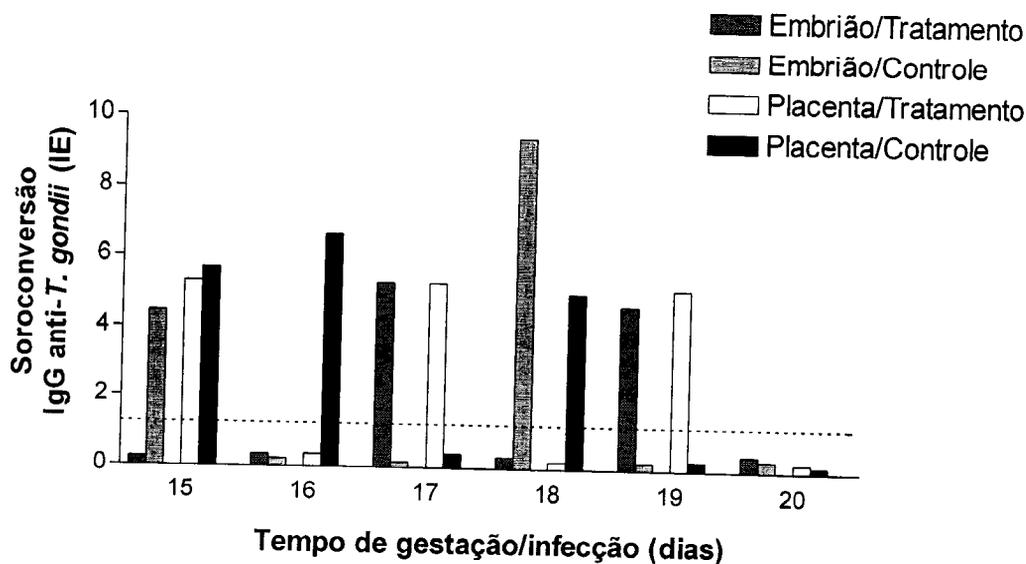


Figura 2: Índices ELISA dos soros de camundongos Swiss inoculados com fígado e cérebro embrionários e placentas de *Calomys callosus* de diferentes idades gestacionais dos grupos tratados com azitromicina e controle.

Ensaio imunohistoquímico

Nas regiões analisadas, encontrou-se o parasita na sua forma livre e, raramente estava presente dentro de vacúolo parasitóforo, demonstrando que nos estágios embrionários, o parasita permanece na sua forma migratória alcançando novas áreas (Figura 3).

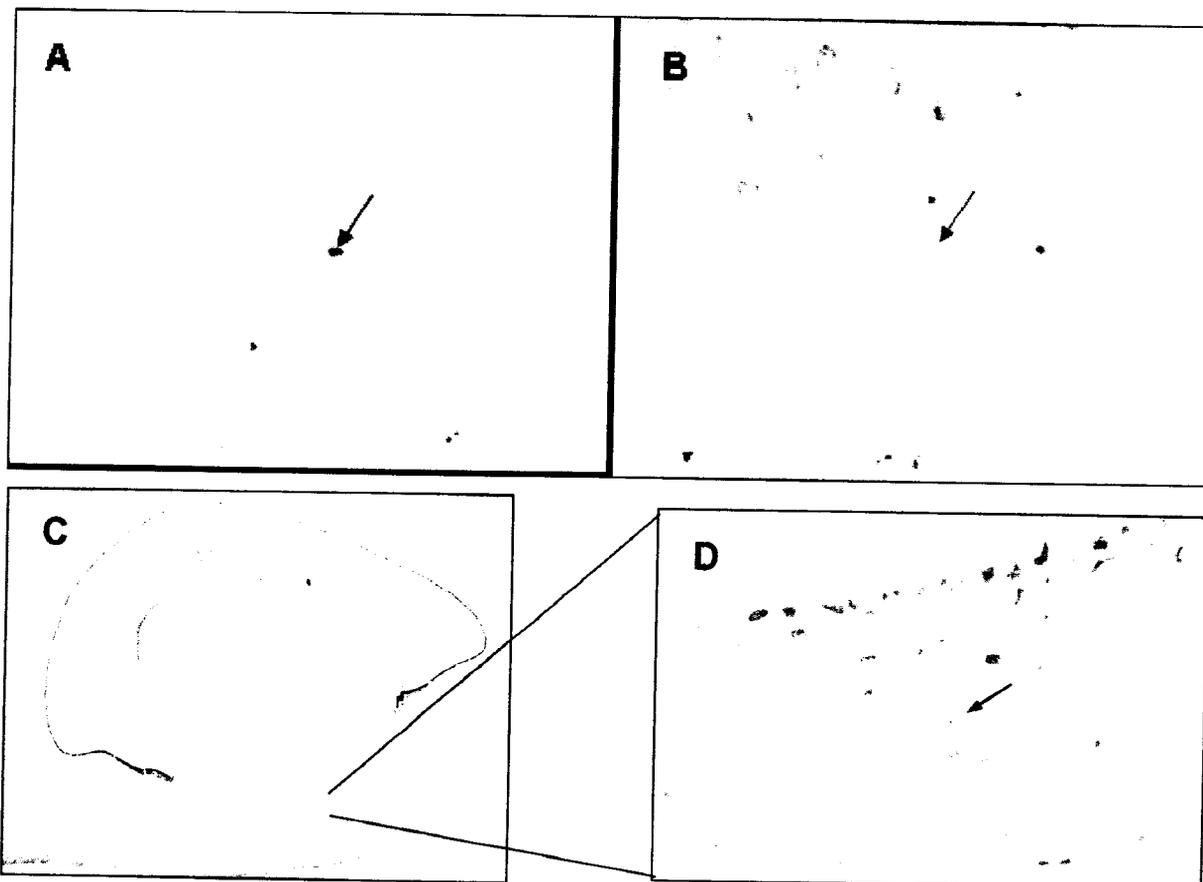


Figura 3: Taquizoítas livres no cérebro e olho de embriões de *C. callosus*. (A) Parasita na região encefálica em feto de 15 dias do grupo controle. (B) área encefálica do embrião de 16 dias pertencente ao grupo tratado com azitromicina. (C) Olho de embrião de 17 dias. (D) aumento da região da córnea com presença de taquizoíta no grupo controle.

Nos ensaios imunohistoquímicos, foram detectados parasitas em todos os animais controles. Foram analisados cérebros e olhos dos embriões, sendo os cérebros mais parasitados que do que os olhos, onde foram encontrados parasitas somente em duas idades gestacionais, 17º e 19º dias de gestação. Nos animais que receberam azitromicina observamos a presença de taquizoítas somente no encéfalo embrionário de 16 dias de gestação (Tabela 1).

Tabela 1: Presença de *T. gondii* em tecidos encefálicos e oculares de fetos de *Calomys callosus* no grupo tratado com azitromicina e no grupo controle em diversas idades gestacionais.

Dias de gestação /inóculo	Controle		Tratado	
	Cérebro	Ocular	Cérebro	Ocular
15	+	-	-	-
16	+	-	+	-
17	+	+	-	-
18	+	-	-	-
19	+	+	-	-
20	+	-	-	-

Cortes da cabeça dos fetos de *Calomys callosus* foram utilizados para detectar parasitas através da técnica de imunohistoquímica marcada com peroxidase

DISCUSSÃO

O risco de infecção fetal é multifatorial e, portanto, dependente do tempo de infecção materna, da competência imunológica, da virulência do parasita, dentre outros. A probabilidade da infecção fetal em humanos é de 1% quando a infecção materna ocorre no período pré-conceptivo, mas aumenta com o progresso da gestação (RORMAN et al., 2006). Em *C. callosus* não há infecção fetal se o contato com o parasita acontecer semanas antes da concepção ficando retido no microambiente placentário (BARBOSA et al., 2006). Todavia, o contato no dia da infecção foi capaz de atingir os encéfalos dos fetos do 15º ao 20º dia de gestação no grupo não tratado como descrito previamente por Ferro et al. (2002).

A infecção por *Toxoplasma* nos primeiros estágios de gestação é a mais grave na gravidez humana. Cerca de 10% dessas infecções desencadeiam em abortos espontâneos ou morte fetal (RORMAN et al., 2006). Nos fetos estudados não houve a ocorrência de indivíduos atrofiados em ambos os grupos infectados (dados não mostrados).

Não há um consenso, na literatura, sobre os mais eficientes programas de *screening* ou tratamentos a serem adotados na infecção materna (SYROCOT, 2007). Há mais de 30 anos, a combinação de pirimetamina e sulfadiazina ou seus derivados e de espiramicina separadamente vêm sendo utilizada no combate à toxoplasmose congênita. Em breve revisão, cinco trabalhos apontam a eficácia de tais medicamentos enquanto outros quatro apontam o inverso (RORMAN et al., 2006). Nesse contexto, novas drogas estão sendo testadas a fim de amenizar os danos causados tanto pela infecção quanto pelos efeitos colaterais das drogas recorrentes.

Dentre a família dos macrolídeos e de outros fármacos testados *in vitro*, a azitromicina demonstrou-se melhor no combate ao *Toxoplasma* (CHANG et al., 1988; CHAMBERLAND et al., 1991; FICHERA; ROSS et al., 1997). A azitromicina é capaz de inibir o crescimento parasitário *in vitro*, mas o seu efeito é observado a longo prazo e com delonga na atividade inibitória na replicação do parasita (CHAMBERLAND et al., 1991). Em experimentos murinos, a azitromicina foi capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos Balb/c infectados com a cepa RH de *T. gondii*. Com resultados semelhantes, o medicamento foi capaz de inibir a passagem parasitária para as regiões encefálicas e oculares fetais de *C. callosus* com exceção do feto com 16 dias de gestação/inóculo.

O diagnóstico para toxoplasmose é difícil e muitas vezes controverso. Gay-Andrey et al. (2003) descreveram dois casos de infecção intrauterina, nos quais o diagnóstico baseou-se

no ultrason fetal do encéfalo embora a análise pelo PCR do fluido amniótico fosse negativo. Um estudo prévio com amostras de soro de mulheres grávidas na fase aguda da infecção por *T. gondii* demonstrou que a presença de IgG e IgM específicas para *Toxoplasma* é um critério insuficiente para a identificação do parasita no início da gestação, pois em algumas infecções agudas este não é detectado (JENUM et al., 1997; RORMAN et al., 2006).

As amostras de soros colhidas dos camundongos Swiss e analisadas pelo ELISA também apontaram equívocos denotadas pela pouca sensibilidade do método e, possivelmente, pela maceração de embriões que não se encontravam infectada, mesmo a sorologia materna sendo positiva. Embora não haja na literatura a porcentagem de transmissão vertical em modelos animais, sabe-se que a transmissão congênita ocorre de 20 a 50% na infecção primária em humanos (JONES, 2001).

A soropositividade dos embriões de 17 e 19 dias de gestação/inóculo que receberam azitromicina pode ser indicativo da presença de parasitas na região hepática uma vez que não houve visualização na área encefálica e ocular dos mesmos. A partir do 16º dia de gestação/inóculo, as células do labirinto (parte morfológica da placenta) apresentam taquizoítas livres concomitante com a infecção cerebral e hepática (FERRO et al., 2002). Em murinos, *T. gondii* é também encontrado primeiramente no fígado e posteriormente no sangue e no cérebro após inoculação intraperitoneal (MINAMITANI et al., 1996). Essa hipótese é reforçada pelo fato de que a azitromicina acumula-se na região cerebral (BLAIS et al., 1993) e de que não houve visualização de parasitas em cortes histoquímicos nas respectivas datas embrionárias. A presença desse estágio livre foi visualizada nas amostras encefálicas e oculares de todos os embriões do grupo controle demonstrando a sua capacidade migratória ainda que no final da gestação desse modelo animal e a capacidade de alcançar novos sítios de replicação (BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

A infecção congênita por *Toxoplasma* pode alcançar as regiões oculares, dentre as principais seqüelas oculares está a coriorretinite, a qual é recorrente nas infecções congênitas e aparecem somente nos primeiros anos de vida ou mais tardiamente dos 20 a 30 anos de idade (RORMAN, et al. 2006). Dificilmente é diagnosticada na vida intrauterina. Nos fetos de *C. callosus* houve ocorrência de taquizoítas livres somente na região ocular dos grupos controle. Em contrapartida, dados de Pereira et al. (1999), demonstram a presença das formas bradizoítas nos olhos de embriões de *C. callosus*. Provavelmente, a data de inóculo nas gestantes possa ser um fator de interferência já que as fêmeas prenhas foram inoculadas no sétimo dia após o aparecimento da rolha vaginal.

A azitromicina demonstra-se, portanto, um fármaco potente no combate à toxoplasmose tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (ARAÚJO et al., 1988; PFEFFERKORN et al., 1994; CHANG et al., 1988, DEGERLI et al., 2003). Além da sua atuação em ambos os estágios de infecção de *Toxoplasma*, possuem a vantagem clínica de menores efeitos colaterais comparado com os atuais fármacos utilizados no combate à doença (MARCHI et al., 1994; DEGERLI, 2003). Relatos de caso demonstram a aplicabilidade da azitromicina como uma alternativa em casos de encefalite toxoplásmica em pacientes HIVs positivos (TROTТА et al., 1997; JACOBSON et al., 2001). Entretanto existe pouca literatura com relação ao uso da azitromicina no combate à toxoplasmose congênita e seus efeitos *in vivo*. Nossos dados demonstraram um efeito positivo da azitromicina reduzindo a infecção dos olhos e cérebro na toxoplasmose congênita.

CONCLUSÃO

C. callomys é um bom modelo experimental para o estudo da toxoplasmose congênita e para tratamentos anti-*Toxoplasma*.

A azitromicina mostra-se eficaz no combate ao *T.gondii* por diminuir a passagem desse aos locais de maiores danos provocados pelo parasita (cérebro e olhos).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F.G.; GUPTILL, D.R.; REMINGTON, J.S. Azithromycin, a macrolide antibiotic with potent activity against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherap**, v.32, n. 5, p. 755-757, 1988.

BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.O.; COSTA, I.N.; PENA, J.D.O.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconception infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, 2006.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **J. Exp. Med.**, v.195, n.12, p. 1625-1633, 2002.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n.9., p. 426-430, 2003.

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Exp Parasitol**, v. 96, p. 89-96, 2000.

BLAIS, J.; GARNEAU, V.; CHAMBERLAND, S. Inhibition of *Toxoplasma gondii* protein synthesis by azitromycin. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.37, n.8., p. 1701-1703, 1993.

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

CHAMBERLAND, S.; KIRST, H.A.; CURRENT, W.L. Comparative activity of macrolides against *Toxoplasma gondii* demonstrating utility of an in vitro microassay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 5, p. 903-909, 1991.

- CHANG, H.R.; PECHERE, J.C.F. In vitro effects of four macrolides (roxithromycin, spiramycin, azithromycin (CP-62,993), and A-56268) on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n.4, p. 524-529, 1988.
- DEGERLI, K.; KILIMCIOUGLU, A.A.; KURT, O.; TAMAY, T.; OZBILGIN, A. Efficacy of azithromycin in murine toxoplasmic model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from Turkey. **Acta Tropica**, v.88, p. 45-50, 2003.
- DEROUM, F.; SANTILLANA-HAVAT, M. Anti-toxoplasma activities of antiretroviral drugs and interactions with pyrimetamine and sulfadiazine in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n.9, p.2575-2577, 2000.
- DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; NIKOLIE, A.; BOBIÉ, V.; KLUN, I.; ALEKSIÉ, A. Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. **Microbes and Infection**, v.7, p.49-54, 2005.
- DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; KLUN, I.; KLAN, A.; NIKOLIC, A.; KNEZEVIC-USAJS.; BOBIC, B.; SIBLEY, L.D. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. **Microbes Infect.**,v.8, n.8, p. 2206-2212, 2006.
- DUBLEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.
- DUBLEY, J.P. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. **Journal of Parasitology**, v. 28, p. 1279-1282, 1998.
- FAVORETO-JUNIOR, S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A. MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p.103-107, 1998.
- FERRO, E. A.; FAVORETO-JUNIOR, S.; BEVILACQUA, E.; SILVA, D. A; MORTARA, R.A.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitol. Res.** v. 85, p. 647- 654, 1999.

- FERRO, E.A.; 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.
- FICHERA, M.E.; ROOS, D.S. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasite. **Nature**, v.390, p. 407-409, 1997.
- FRANCISCO, F. M.; SOUZA, S.L.; GENNARI, S.M.; PINHEIRO, S.R.; MURADIAN, V; SOARES, R.M. Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in the São Paulo municipality, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.48, n.3, p. 167-170, 2006.
- GAY-ANDRIEU, F.; MARTY, P. PIALAT, J.; SOURNIES, G.; DIER DE LAFORTE, T.; PEYRON, F. Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. **Prenat. Diagn**, v.53, p. 553-560, 2003.
- GOMES, U.A.; TERMEL, J.R.; FERRIOLI – FILHO, F.; NOGUEIRA, J.L. Incidence of *Toxoplasma gondii* infections in rural and urban areas. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 17, n.6, p. 355-360, 1975.
- GRIGG, M.E.; BOOTHROYD, J.C. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 112, p. 8-12, 2006.
- HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 137, n.1, p. 1-17, 2004.
- JACOBSON, J.M.; HAFNER, R.; REMINGTON, J.; FARTHING, C.; HOLDEN-WILTSE, J.; BOSLER, E.M.; HARRIS, C.; JAYAWEERA, D.T.; ROQUE, C.; LUFT, B.J. Dose-escalation, phase I/II study of azithromycin and pyrimethamine for the treatment of toxoplasmic encephalitis in AIDs. **AIDS**, v. 15, p. 583-589, 2001.
- JONES, J.L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstet. Gynecol. Sury.**, v. 56, n. 5, p. 296-305, 2001.

- JONES, J.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. **American Family Physician**, v.67, n. 10, p. 2131-2138, 2003.
- JONES, L.A.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C.W. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. **Parasite Immunology**, v.28, p. 635-642, 2006.
- JENUN, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A.G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma Immunoglobulin G avidity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 1972-1977, 1997.
- LESCANO, S.A.Z.; AMADO-NETO, V., CHIEFFI, P.P.; BEZERRA, R.C.; GAKIZA E.; FERREIRA, C.S.; BRAZ, L.M.A. Avaliação da eficácia da azitromicina e pirimetamia em camundongos infectados por cepa cistogênica de *Toxoplasma gondii*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n.6, p. 460-462, 2004.
- DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; NIKOLIE, A.; BOBIÉ, V.; KLUN, I.; ALEKSIÉ, A. Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. **Microbes and Infection**, v.7, p.49-54, 2005.
- MARCHI, M.; VACONDIO, R.; BAGNULO, A.; MENGOLI, M. Azithromycin-omeprazoli: treatment for eradication of *Helicobacter pylori*. **Minerva Gastroenterol Dietol**, v.40, n. 1, p. 47-49, 1994.
- MINAMITANI, M.; TANAKA, J.; SUZUKI, Y. Pathomechanism of cerebral hypoplasia in experimental toxoplasmosis in murine fetuses. **Early Human Development**, v.44, p. 37-50, 1996.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet, London**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, O.G. *Toxoplasma gondii*, In: **Parasitologia humana**, 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2003, cap. 18, p. 147-156.

- PEREIRA, M. F.; SILVA, D. A. O.; FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R. Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-114, 1999.
- PFEFFERKORN, E.R.; BOROTZ, S.E. Comparison of mutants of *Toxoplasma gondii* selected for resistance to azithromycin, spiramicin, or clindamicyn. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n.1, p. 31-37, 1994.
- REMINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. In: **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 5 ed. Cap. 5: Toxoplasmosis, 2001, p. 205-345.
- RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEM-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 458-472, 2006.
- RUSSO, M.; PERGOLA, G.; PERDICINI, G. Ocular toxoplasmosis: our experience. **Infec. Méd.**, v.3, n. 13, p. 160-167, 2005.
- SEGUNDO, G.R.S.; SILVA, D.A.O, MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brasil. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p. 13-17, 2004.
- SCHMIDT, D.R.; HOGH, B.; ANDERSEN, O.; FUNCHS, J.; FLEDELIUS, H.; PETERSEN, E. The national neonatal screening programme for congenital toxoplasmosis in Denmark: results from initial four years, 1999-2002. **Acrh. Dis. Chil.** v.8, p. 661-665, 2006.
- SCHWAB, J.C.; CAO, Y.; SLOWIK, M.R.; JOINER, K.A. Localization of azithromycin in *Toxoplasma gondii*-infected cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, n.7. p. 1620-1627, 1994.
- SYROCOT (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) study group; THIEBAUT, R.; LEPROUST, S.; CHENE G, GILBERT R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. **Lancet**, v.369, p. 115-122, 2007.

TROTTA, M.; STERRANTINO, G.; MILO, D.; DRANÍSIO, D.; LEONCINI, F. Azithromycin combined with pyrimetamine in the treatment of neurotoxoplasis, in na AIDs pacient. **Minerva Med**, v. 88, n. 3, p. 117-179, 1997.

VALLOCHI, A.L., MUCCIOLI, C.; MARTINS, M.C.; SILVEIRA, C.; RIZZO, L.V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in human in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, p. 350-351, 2005.