



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Carla Duque Lopes

**Azitromicina inibe a infecção por *Toxoplasma gondii* em oculares de fetos
e reduz o parasitismo na infecção congênita e adquirida em modelo
experimental de *Calomys callosus***

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Uberlândia – MG

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**Azitromicina inibe a infecção por *Toxoplasma gondii* em oculares de fetos
e reduz o parasitismo na infecção congênita e adquirida em modelo
experimental de *Calomys callosus***

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Orientadora: Profa. Dra. Janethe D. O. Pena

Uberlândia – MG

2008

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Imunologia Ocular, de Imunoparasitologia e Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob a orientação da Profª Drª Janethe Deolina de Oliveira Pena e apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

DEDICO ESPECIALMENTE...

Ao PAI, grande mestre das obras divinas, obrigada por permitir, ao longo desses dois anos, que eu aprendesse a compartilhar, a conviver e a trocar experiências. A Ser mais humilde com os meus semelhantes e à respeitar todas as criaturas com as quais possibilitaram esse trabalho.

Aos meus pais pela dedicação imensa em não reclamar das minhas constantes ausências, pelos conselhos e pela preocupação. Amo-os muito!

As minhas irmãs, Tania e Nadia, pelos momentos de alegria quando pudemos estar juntas.

Ao colorido da minha vida, meu companheiro, Heitor, pela compreensão, pelas puxadas de orelha, por me apoiar a cada dia e pela retribuição de tamanho amor.

As minhas irmãs de coração, minha família aqui de Uberlândia, Ana Paula e Flávia, pelo grande carinho, pelos colos constantes, pelo ombro amigo, pelos momentos de alegria e por fazerem do meu lar um cantinho tão alegre e gostoso de voltar.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

À orientação da Prof^ª Dr^ª Janethe pela oportunidade de exercer e abraçar a profissão que tanto gosto;

A Prof^ª Dr^ª Neide, pela co-orientação, paciência e colaboração nas partes experimentais.

A Prof^ª Dr^ª Eloísa por ceder os animais e o espaço físico para a realização dos experimentos;

A Prof^ª Dr^ª Maria Cristina por ceder o espaço do laboratório para a realização da parte molecular;

A Deise por me ajudar com a parte sorológica;

Ao Emerson e a Marise por me apoiarem e ajudarem, no finalzinho desse trabalho, e pela extrema competência na realização da parte molecular do estudo;

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

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

E finalmente ao CNPq pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Sistema avidina biotina
BSA	Bovine serum albumin
DAB	3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DHPS	Dihidropteroato sintase
DHS	Dihidrofolato redutase
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	U.S. Food and Drug Administration
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
ON	<i>Overnight</i>
PABA	Ácido Para-aminobenzoico
PBS	Tampão salina
PBST	Tampão salina fosfato com Tween fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SPAf	Sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico
STAg	Solução de antígeno total de <i>T. gondii</i>
TA	Temperatura ambiente
TE	Encefalite toxoplásmica

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, amplamente distribuído e que causa danos graves aos fetos quando são transmitidos durante a gestação e em adultos imunossuprimidos. As drogas mais utilizadas para o tratamento da toxoplasmose são a combinação de medicamentos: sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico. Entretanto, essas drogas demonstram graves efeitos colaterais e, atualmente, a sua eficácia é bastante discutida na literatura. Outros medicamentos são tidos como alternativos ao tratamento da toxoplasmose adquirida, dentre eles a clindamicina, a atovaquona e a azitromicina. Essa última demonstra-se eficaz no combate as formas taquizoítas e bradizoítas, “*in vitro*”, do parasita e apresenta-se com poucos efeitos colaterais na prática clínica. Neste estudo testamos a eficácia da azitromicina na redução da transmissão congênita de *Toxoplasma* analisando olhos de fetos de *Calomys callosus*, bem como da infecção adquirida em adultos através da análise do tecido cerebral de fêmeas prenhes e de machos imunocompetentes. Para a avaliação da infecção vertical, fêmeas de *C. callosus* foram inoculadas, oralmente, com 20 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* no 1º dia de gestação e tratadas com os diferentes protocolos. Os fetos foram coletados nos dias 15, 17 e 19 de gestação-infecção materna. As fêmeas foram divididas em três grupos de tratamento: PBS, azitromicina (300mg/Kg/dia) e a combinação (SPAf) de sulfadiazina (100 ou 75 mg/Kg/dia), pirimetamina (100 ou 50mg/Kg/dia) e ácido folínico (15mg/Kg/dia). Os medicamentos foram administrados oralmente em diferentes dias após a infecção. As fêmeas foram sangradas no primeiro dia de gestação e no dia do sacrifício para a realização de teste ELISA para confirmar soroconversão. Para análise da infecção adquirida, machos de *C. callosus* seguiram o mesmo protocolo de infecção e tratamento das fêmeas grávidas, mas por tempos diferentes. Os cérebros maternos e de machos adultos, bem como os olhos dos fetos foram dissecados e embebidos em parafina para análise por imunohistoquímica usando anticorpo policlonal anti-*T. gondii*. Um dos olhos de fetos sacrificados no 19º dia foi utilizado para a detecção de DNA do parasita pela técnica de PCR em tempo real. A quantidade de parasitas estava significativamente reduzida em tecido cerebral das fêmeas tratadas com azitromicina quando comparados a SPAf ou com veículo. Nas regiões oculares fetais, não foram detectados parasitas nos animais tratados com azitromicina. Não houve diferença na infecção ocular fetal entre os animais tratados com a SPAf ou PBS. Na infecção adquirida, a azitromicina reduziu a quantidade de parasitas em vacúolos parasitóforos e estruturas como cistos. Nosso trabalho demonstrou a eficácia da azitromicina no combate à infecção ocular congênita, na redução da carga parasitária nos cérebros maternos e de machos adultos imunocompetentes mostrando ser uma possível alternativa no tratamento da toxoplasmose.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, infecção congênita, infecção adquirida, azitromicina, *Calomys callosus*.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite of large geographical distribution that causes severe sequelae to fetuses of mothers infected for the first time during pregnancy and in immunosuppressed adults. The drugs most frequently used for the treatment of toxoplasmosis are a combination of sulfadiazine and pirimethamine plus folinic acid. However, these drugs present severe side effects and currently their efficacy is under study. Other medicines that are considered as alternatives for the treatment are clindamycin, atovaquone and azithromycin. The latter has demonstrated to be effective against both tachyzoites and bradyzoites *in vitro* with lesser side effects in clinical practice. In this study we tested the efficacy of azithromycin on the reduction of vertical transmission of *Toxoplasma*, by the analyses of fetal eyes of *Calomys callosus*, as well as the acquired adult infection analyzing brains of the mothers and adult males. For the analysis of the treatment on the vertical transmission, females of *C. callosus* were inoculated perorally with 20 cysts of the ME49 strain of *T. gondii* on the first day of pregnancy and then received the different treatments. Fetuses and mothers' brains were collected on days 15, 17 e 19 of gestation/infection. Females were sorted into three treatment groups: control (vehicle), azithromycin (300mg/kg/dia) and the association of the drugs sulfadiazine (100 or 75 mg/Kg/day), pyrimethamine (100 or 50mg/Kg/day) and folinic acid (15mg/Kg/day). The drugs were administered orally starting at different days post-infection and animals were bled on the first day of pregnancy and on the day of sacrifice to perform ELISA tests for the detection of anti-*T. gondii* antibodies. For the analyses of acquired infection, adult males were infected and treated using the same drugs as the females, for either the same or longer periods. After treatment, animals were sacrificed and the brains were collected from the adults and eyes from the fetuses. All samples were processed for immunohistochemistry, using a polyclonal antibody against *T.gondii*, while one of the eyes of fetuses from day 19 were also processed for real time PCR detection of parasite DNA. Parasite load was significantly reduced in brain tissues of females treated with azithromycin when compared to SPAF treatment. In fetuses of azithromycin-treated mothers no parasites were detected in the eyes analyzed. No difference was seen in parasite load when the SPAF-treated group was compared to the control group. In brain tissues of adult males, there was significant reduction in parasite numbers in the azithromycin-treated animals. Our study demonstrated a good efficacy of azithromycin for the treatment of pregnant females, diminishing fetal ocular infection, as well as for the treatment of adult animals, representing an alternative choice for the treatment of toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, congenital infection, acquired infection, azithromycin, *Calomys callosus*.

Sumário

INTRODUÇÃO	11
1.1. Morfologia	11
1.2. Ciclo de Vida	12
1.3. Meios de Infecção	13
1.4. Quebra de barreiras imunológicas	14
1.5. Grupos de risco	16
1.6. Reativação em imunodeprimidos.....	16
1.7. Infecção congênita	17
1.8. Toxoplasmose ocular	18
1.9. Tratamentos	19
1.9.1-Espiramicina.....	20
1.9.2-Pirimetamina, Sulfadiazina e Ácido folínico.....	21
1.9.3-Azitromicina.....	24
1.10. Cepas de <i>Toxoplasma</i>	25
1.11. <i>Calomys callosus</i>	26
OBJETIVOS	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Animais.....	29
2.2. Parasitas	29
2.3. Tratamento	30
• 2.3.1-Fêmeas.....	30
• 2.3.2-Machos	31
2.4. Imunoperoxidase.....	32
2.5. ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	32
2.6. Quantificação da carga parasitária.....	33
• 2.6.1-Extração de DNA de <i>T. gondii</i> para construção da curva padrão.....	34
• 2.6.2-Construção das curvas padrão	34
• 2.6.3-PCR em tempo real para carga parasitária.....	34
2.7. Análise Estatística.....	35
RESULTADOS	36
3.1. <i>Toxoplasma</i> nos tecidos oculares dos fetos	36
3.2. Efeito do tratamento na infecção sistêmica das fêmeas prenhas	40

3.3. Infecção crônica em fêmeas fertilizadas de <i>C. callosus</i>	43
3.4. Efeito do tratamento na infecção adquirida em machos imunocompetentes	46
3.4.1-Infecção cerebral em machos de <i>C. callosus</i> sacrificados logo após os tratamentos	46
3.4.2-Infecção cerebral em machos de <i>C. callosus</i> sacrificados 30 dias após o término do tratamento	50
3.4.3. Infecção crônica por <i>T. gondii</i> no cérebro de <i>C. callosus</i> tratados no mesmo período...	53
CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídio 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; CARRUTHERS, 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 taxa de infecção varia de 40-80% (GOMES et al., 1975; NEVES, 2003).

A prevalência de anticorpos específicos para *T. gondii* é diretamente proporcional à idade (RORMAN et al., 2006). Dados recentes mostrados por Francisco et al. (2006), indicam um alto índice de soroprevalência (56%) entre adolescentes de 13 a 15 anos comparados a 5,8% de crianças entre 1 a 3 anos de idade na cidade de São Paulo. A toxoplasmose nos Estados Unidos representa a terceira causa de morte mais comum por ingestão de alimentos contaminados (CARRUTHERS, 2002).

1.1. Morfologia

Toxoplasma gondii pertence ao filo Apicomplexa cuja classificação designa aos parasitas intracelulares que possuem uma estrutura celular polarizada, com um complexo

citoesqueleto e um arranjo de organelas na região apical dos parasitas (BLACK; BOOTHROYD, 2000). No complexo apical são encontrados o conóide, dois anéis polares, microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos (NEVES, 2003). Outros patógenos humanos que se inserem nesse filo são *Plasmodium* sp, *Cryptosporidium* sp e patógenos animais como *Eimeria* sp e *Sarcocystis* sp (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

1.2. Ciclo de Vida

O ciclo de vida de *T. gondii* consiste de dois estágios - assexuado e sexuado. A forma assexuada de replicação rápida, taquizoíta, infecta os hospedeiros intermediários, no qual estão incluídos mamíferos e aves. Os taquizoítas possuem forma de crescente e são capaz de infectar, praticamente, qualquer célula nucleada. Após penetração ativa na célula forma-se um vacúolo parasitóforo, no qual multiplicam com rapidez, dentro de 6 a 8 horas *in vitro*. A resposta imune e a transformação dos taquizoítas em bradizoítas limitam o estágio agudo da infecção e, então, a fase crônica se estabelece (LYONS et al., 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). 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 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 (MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

O estágio sexuado do *Toxoplasma* 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 e, sob

condições ambientais favoráveis, os oocistos esporulam dentro de 3 semanas. Esses podem espalhar pelo ambiente contaminando as águas, solos, frutas, verduras e os animais 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 (NEVES, 2003; RORMAN et al., 2006).

1.3. Meios de Infecção

As infecções por *Toxoplasma gondii* ocorrem de modo acidental e, em geral, a via oral é a maior fonte de contágio. A infecção pelo parasita está correlacionada com os hábitos alimentares e higiene da população (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A contaminação é realizada por meio da ingestão de carnes cruas ou mal passadas que contenham cistos, pela ingestão de água ou alimentos contaminados 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 (DUBEY, 1998a). (Figura 1).

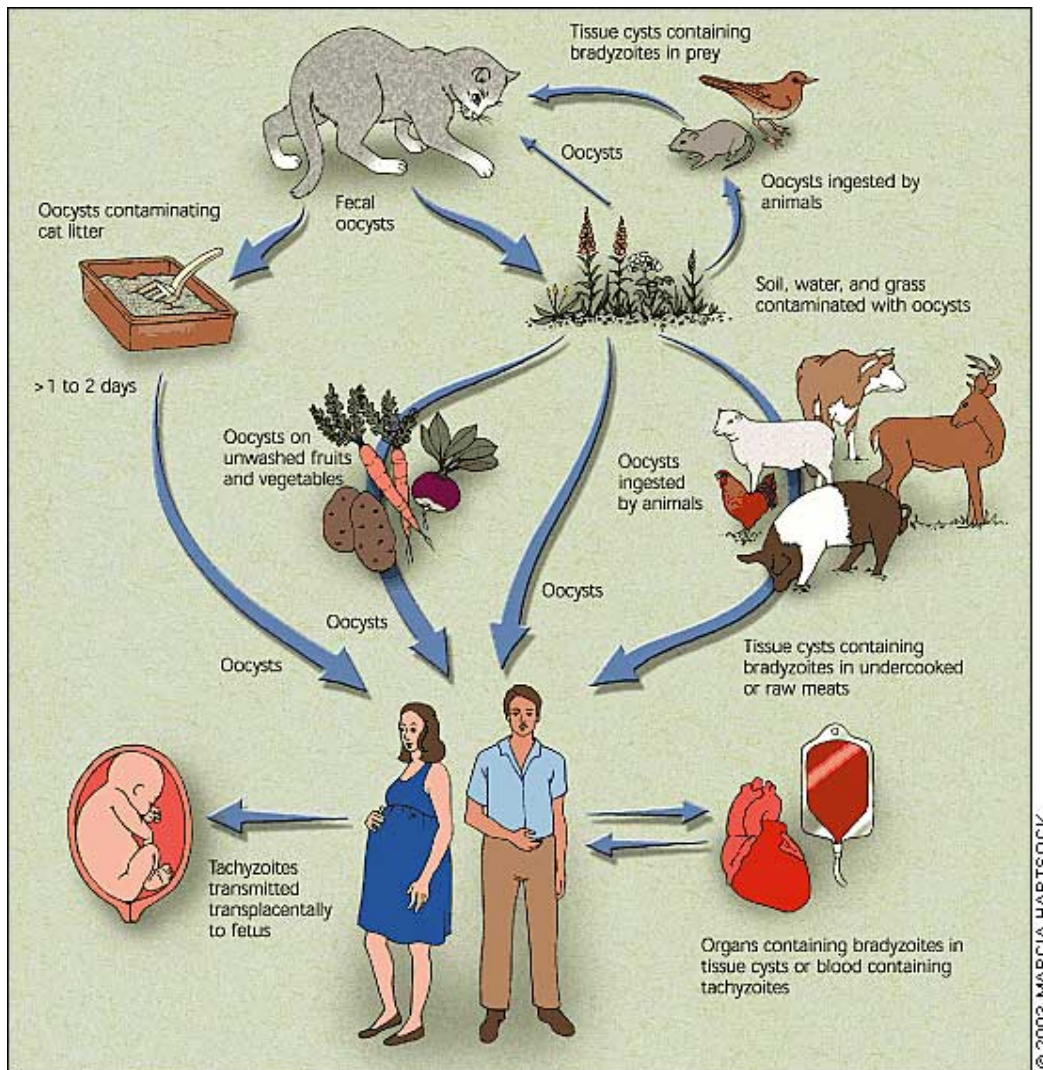


Figura 1: Vias da infecção por *Toxoplasma gondii*. Figura adaptada de Jones *et al.* (2003).

1.4. Quebra de barreiras imunológicas

Durante as infecções naturais orais, *Toxoplasma* é capaz de penetrar o epitélio intestinal, disseminar-se por tecidos mais profundos e atravessar barreiras biológicas como placenta, barreiras hemato-encefálica e a hemato-retiniana, alcançando sítios de imunoprivilegio. São nesses locais onde o parasita causa as patologias mais graves (BARRAGAN; 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 (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 (BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

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 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 mantém a função da barreira, tais como a secreção de imunoglobulina A (IgA) secretora (DUBEY, 1998a).

A quebra dessas barreiras do hospedeiro é um requisito para levar à disseminação e ao estabelecimento da infecção por *T. gondii*. Recentemente descobriu-se que *Toxoplasma* é capaz de cruzar monocamadas de células, o que pode ser importante na passagem transplacentária do parasito, já que células maternas normalmente não trafegam para o feto (BARRAGAN; SIBLEY, 2003)

1.5. Grupos de risco

A toxoplasmose é, em geral, assintomática em indivíduos imunocompetentes. Estima-se que 1/3 da população mundial de adultos esteja infectada por *T. gondii*. A prevalência de indivíduos soropositivos para a toxoplasmose varia entre diferentes populações, dependendo dos hábitos alimentares, clima, etc (CHOWDHURY, 1986; ROTHOVA, 1993). Dentre as manifestações clínicas iniciais observam-se linfadenopatia, especialmente cervical, febre, mialgia, náuseas e, hepato-esplenomegalia. Esses sintomas resolvem-se em poucos dias ou meses e, muitas vezes, a doença não é diagnosticada (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Entretanto, as infecções fatais resultam de duas circunstâncias principais: da transmissão congênita ou por meio de reativações da infecção latente durante disfunções imunes.

1.6. Reativação em imunodeprimidos

As reativações são causadas pela ruptura dos cistos teciduais seguida pela proliferação de taquizoítas (SUZUKI, 2002). As reativações ocorrem em indivíduos imunodeprimidos moderados ou graves. 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 imunossuprimidos, especialmente em portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (BLACK; BOOTHROYD, 2000). A encefalite toxoplásmica é a manifestação mais comum e, se não tratada, pode ocasionar graves lesões cerebrais (LESCANO et al., 2004). Outras manifestações são lesões oculares na retina, esclera ou coróide (HOLLAND, 2003).

A toxoplasmose tem emergido nas últimas duas décadas como uma das mais comuns infecções oportunistas associadas à AIDS (CARRUTHERS, 2002). O tratamento

utilizado correntemente não elimina o estágio de bradizoíta encontrado na fase crônica. Se descoberta tardiamente, a encefalite toxoplásmica pode ser fatal (BLACK; BOOTHROYD, 2000). O tratamento com terapias imunossupressoras, como por exemplo, em pacientes transplantados e neoplásicos tornam-nos vulneráveis à reativação ou à infecção primária sintomática por toxoplasmose (CARRUTHERS, 2002).

1.7. 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 et al., 2003). Segundo estudos de Barragan e Sibley (2003), a barreira é ativamente quebrada por migrações do parasita.

A gravidade das infecções congênitas depende da idade gestacional quando a infecção primária ocorre. Em fetos humanos, a doença está associada com graves distúrbios congênitos quando a infecção acontece no primeiro trimestre da gestação (REMINGTON, 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; RORMAN et al., 2006) 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 et al., 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 intra-uterina. Durante o terceiro trimestre, a probabilidade de passagem placentária de *T. gondii* em humanos é de 60% (MONTOYA; LIESENFELD,

2004). Aproximadamente 75% das crianças que nascem com toxoplasmose não são sintomáticas ao nascimento (GUERINA et al., 1994; LEBECH et al., 1999). A infecção pode reativar durante a infância, na puberdade ou na vida adulta (KOPPE et al., 1986). 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 (JONES et al., 2001; DJURKOVIC-DJAKOVIC et al., 2005).

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).

Diante da gravidade da infecção congênita, testes pré-natais para a detecção de anticorpos anti-*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 lesões ao feto.

1.8. Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular é comumente consequência de infecções congênitas, podendo resultar também de infecções adquiridas (JONES et al., 2006). A toxoplasmose ocular de origem congênita em recém-nascidos foi descrita primeiramente em 1923 (JANKÚ, 1923), enquanto a infecção ocular em adultos foi reconhecida somente em 1952 (WILDER, 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 (HOLLAND, 2003).

A toxoplasmose ocular pode ser uma doença progressiva e recorrente que ameaça a visão. Quando de origem congênita, a retinocoroidite desenvolve-se gradualmente em semanas ou anos de forma subclínica. Esta se apresenta, freqüentemente, bilateral com manchas esbranquiçadas ou escuras. A toxoplasmose adquirida também pode progredir para a retinocoroidite que é, em geral, uniocular (RUSSO et al., 2005). No entanto, na rotina clínica uma diferenciação entre doença congênita e adquirida é problemática e normalmente não mais que sugestiva (JONES et al., 2006).

No Brasil, a retinocoroidite toxoplásmica é considerada uma das infecções mais comuns da retina e a causa maior de uveíte posterior. 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 gravidade da doença pode estar relacionada com a cepa 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).

1.9. Tratamentos

Atualmente existem no mercado poucas drogas cujo objetivo é impedir a transmissão da toxoplasmose da mãe para o feto e, portanto, utilizadas somente durante a fase aguda da doença. Esses medicamentos atuam contra as formas proliferativas, mas não contra os cistos, característicos da fase crônica e contra os quais ainda não há fármacos eficazes (NEVES, 2003). A droga ideal para o tratamento da infecção primária durante a gravidez deve apresentar penetração efetiva e concentração na placenta, possuir

propriedades parasitocidas contra os diferentes estágios do parasita, ser efetiva contra cistos, distribuir-se nos sítios principais de infecção, bem como ser de baixa toxicidade e sem efeitos teratogênicos. No entanto, nenhuma droga que apresente tais características foi desenvolvida até o momento (DEROUIN; SANTILLANA-HAYAT, 2000).

De acordo com REMINGTON (2001) o tratamento para mulheres gestantes segue-se distintamente ao tempo de infecção primária e se há infecção fetal. Dessa maneira, se a mãe estiver infectada e não o bebê, o fármaco recomendado é a espiromicina, mas se ambos tiverem contraído a infecção utiliza-se a associação pirimetamina/sulfadiazina/ácido folínico, exceto no primeiro trimestre de gestação.

1.9.1-Espiramicina

A espiromicina é um macrolídeo bem tolerado pelas gestantes. Concentra-se nos tecidos placentários e sua ação restringe-se a esse micro-ambiente reduzindo o risco de contaminação do feto pela passagem transplacentária. Sua concentração plasmática é duas vezes maior que no sangue do cordão umbilical enquanto a concentração placentária é cinco vezes maior em relação à concentração encontrada no soro materno (GARIN et al, 1969). Schoondermark-Van de Ven (1994) demonstrou que esse medicamento é encontrado, também, em tecidos fetais com exceção do encéfalo durante a infecção congênita em macaco *Rhesus*. A espiromicina tem sido usada, por décadas, como tratamento no combate à toxoplasmose aguda em gestantes. É comumente utilizada na Comunidade Européia e, em um estudo clássico, demonstrou ter uma redução de quase 60% no risco de transmissão fetal durante as primo-infecções maternas (de 56 a 23%) (DESMONTS; COVREUR, 1974). Entretanto, um estudo multicêntrico mostrou que o tratamento com a espiromicina possui pouco impacto na passagem parasitária para o feto (considerando 82% dos casos), mas diminuiu as seqüelas nos infantes infectados

(FOULON et al., 1999). Devido aos efeitos da espiromicina ainda não serem comprovados em estudos randomizados, o FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) não aprova a utilização da droga para tratamento de gestantes com toxoplasmose aguda nos Estados Unidos. Em murinos infectados pela cepa ME49 de *T. gondii*, o tratamento com espiromicina reduz o número de cistos durante ambas as fases aguda e crônica da doença adquirida, além de aumentar a taxa de sobrevivência do animal (GRUJIC et al., 2005).

1.9.2-Pirimetamina, Sulfadiazina e Ácido folínico

Por mais de 50 anos, o tratamento mais comum contra a toxoplasmose em humanos é a associação de pirimetamina e sulfadiazina ou sulfadoxinas, que demonstram serem eficientes no combate à encefalite toxoplásmica (EYLES; COLEMAN, 1955). Sulfadoxinas e pirimetamina foram retiradas como drogas profiláticas contra a malária devido ao aparecimento de casos da Síndrome de Stevens-Johnson (PHILLIPS-HOWARD; WEST, 1990), mas permanece em uso em países africanos no tratamento da doença.

Os compostos de folato são co-fatores essenciais para diversas etapas metabólicas críticas incluindo a formação dos nucleotídeos purinas e pirimidinas. A pirimetamina somada à sulfadiazina e seus derivados são inibidores das vias de síntese de folato. A pirimetamina tem afinidade para a enzima dihidrofolato redutase (DHFR) do parasita (DEROUIN; CHASTANG, 1989). Essa enzima é responsável pela manutenção de *pools*, no estado fisiológico reduzido, do folato. Ao contrário das células mamíferas, que possuem um sistema de transporte ativo mediado por carreadores responsáveis pela captura de folatos, os taquizoítas de *T. gondii* são incapazes de transportar compostos da sua estrutura clássica (pteroyl-glutamato) (ALLEGRA et al., 1987).

A sulfadiazina inibe a dihidropteroato sintase (DHPS) e evita o uso apropriado do ácido para-aminobenzoico local (PABA) para a síntese do ácido fólico e é uma das

enzimas responsáveis pela síntese *de novo* da molécula do folato. Somente as células mamíferas não possuem essa via de síntese (GROSSMAN; REMINGTON; 1979).

As duas drogas juntas possuem, portanto, um efeito sinérgico (DEROUIN; CHASTANG, 1989). Ambas as enzimas são essenciais para a sobrevivência e replicação dos taquizoítas de *T. gondii* (EYLES; COLEMAN, 1955), embora não ajam sobre a forma cística da doença. A associação entre sulfadiazina e pirimetamina é capaz de reduzir, “*in vitro*”, em 50% a multiplicação parasitária, após um período de exposição de 20 horas às drogas (CHAMBERLAND et al., 1991).

A pirimetamina possui uma meia-vida longa de, aproximadamente, 85 horas e 80 a 90% dela permanece conjugada a proteínas o que favorece a sua longa permanência no plasma sendo transformada em vários metabólitos. Sua absorção pelo trato gastrointestinal é lenta. Distribui-se por diversos órgãos como rins, fígado, pulmão, baço e células sanguíneas (SILVA et al., 1998; JOHANNESSEN et al., 2005).

A sulfadiazina, substância derivada das sulfonamidas, pode ser considerada derivada das sulfanilamidas. Uma vez absorvida, distribui-se por todos os tecidos e líquidos do organismo podendo ser encontradas variadas concentrações desse medicamento na bile, sucos digestivos e líquido pleural. Atravessa facilmente a placenta, atingindo a circulação fetal. A concentração plasmática média varia entre 30 a 80µg/ml quando a dosagem administrada é de 400 a 800mg em adultos (REEVES et al., 1979). Em neonatos, a concentração plasmática da droga varia entre os estudos de 35 a 123µg/ml ou de 44 a 86µg/ml, quando administrados 50 ou 100mg/Kg/dia da droga, respectivamente. A concentração plasmática da pirimetamina pode variar de 1,3 a 2,2µg/ml após doses de 1 a 2mg/Kg de peso corporal (JOHANNESSEN et al., 2005; SCHMIDT et al., 2006). A concentração plasmática capaz de inibir a replicação do *Toxoplasma* é de 0,1µg/ml de pirimetamina e 6,3µg/ml de sulfadiazina. Entretanto a concentração plasmática dessas

drogas chega a ser até dez vezes maior em crianças com até um ano de vida (SCHMIDT et al., 2006).

A dihidrofolato redutase (DHPR) também está presente, em menor intensidade, em humanos e o tratamento com inibidores de DHPR induz a deficiência de folato e, possivelmente, é responsável por efeitos colaterais hematológicos (anemia, neutropenia, leucopenia e trombocitopenia) e embriotóxicos (FUNG; KIRSCHENBAUN, 1996), sendo que a terapêutica prolongada provoca supressão da medula óssea. Além disso é teratogênica e, portanto, o seu uso só é recomendando somente após a 18ª semana de gestação (ARAÚJO et al., 1988; BRAZ et al., 1999; DERGELI et al., 2003, MONTOYA; LIESENFELD 2004)

O ácido fólico (ácido pteriol-glutâmico e folacina) é utilizado sempre em associação com vários fármacos no tratamento da toxoplasmose. Encontra-se amplamente distribuído nos alimentos e é facilmente absorvido pela mucosa duodenal. No organismo, o ácido transforma-se em coenzimas que se distribuem por diversos órgãos, concentrando-se, principalmente no fígado, onde converte em ácido folínico, e é este último administrado juntamente com a pirimetamina com a finalidade de diminuir a supressão da medula óssea (MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Na literatura há várias divergências com relação a real eficácia das drogas usuais no combate a toxoplasmose. Em breve revisão, cinco trabalhos apontam a eficácia de tais medicamentos enquanto outros quatro apontam o inverso (RORMAN et al., 2006). Há de se considerar ainda os diversos efeitos colaterais e as resistências de cepas à pirimetamina e aos derivados de sulfadiazina em *Plasmodium falciparum* “in vivo” (FERNANDES et al., 2007) e “in vitro” e “in vivo” em cepas mutantes de *T. gondii* (REYNOLDS; ROSS, 1998; REYNOLDS et al., 2001; MENECEUR et al., 2008). Outros fármacos como a clindamicina e o trimetoprim-sulfametoxalone (derivado de sulfa), não apresentam a

mesma eficácia na redução da replicação de *T. gondii*, quando comparada à combinação sulfadiazina-pirimetamina (ARAUJO et al., 1988). Faz-se então necessário o desenvolvimento ou a utilização de novas terapias, especialmente no tratamento da toxoplasmose congênita.

1.9.3-Azitromicina

A azitromicina, um macrolídeo derivado da eritromicina, é conhecida pela sua atividade na inibição da síntese protéica bacteriana (BLAIS et al., 1993) e demonstra ter uma potente atividade contra a toxoplasmose por apresentar uma atividade inibitória prolongada sobre a replicação intracelular de taquizoítas (CHAMBERLAND et al., 1991). Em sua distribuição subcelular, o fármaco acumula-se nas organelas acidificadas dos parasitas e nas células hospedeiras. Esse acúmulo permite que a droga se ligue na subunidade 70S do ribossomo do parasita dificultando a síntese protéica e multiplicação intracelular. Blais e colaboradores, (1993) demonstraram que a azitromicina interfere na síntese de RNA e, por consequência, inibe a síntese protéica. Não há presença da droga nos vacúolos parasitóforos, uma vez que não possuem características ácidas (SCHWAB et al., 1994). A azitromicina é capaz de se acumular, em alta concentração, em vários tipos celulares como macrófagos, células polimorfonucleares e fibroblastos (GLADUE; SNIDER, 1990). As concentrações intracelulares da droga nas células infectadas são muito superiores àquela necessária para inibir a síntese protéica de *T. gondii* (BLAIS et al., 1994). A azitromicina, em fibroblastos, inibe a aderência de microorganismos. Os fibroblastos secretam e se ligam à fibronectina o que facilita a aderência de microorganismos e a união entre outras células (HAMILL, 1987).

Estudos *in vitro* da replicação do apicoplasto, o DNA circular de 35 Kb o qual se encontra na região apical do núcleo de *T. gondii*, demonstra que a azitromicina também impediria, indiretamente, a replicação do parasita (FISCHEIRA; ROOS, 1997).

A azitromicina também é efetiva contra bradizoítas “*in vitro*”, mas a sua administração prolongada a animais infectados cronicamente com *T. gondii* falha em reduzir o número de cistos cerebrais (DEROUIN, 1995). Entretanto, mostra-se eficaz em modelo animal de encefalite toxoplásmica (LESCANO et al., 2004) e tem sido usada em pacientes aidéticos com encefalite toxoplásmica, combinada a outras drogas como a sulfadiazina e/ou a pirimetamina (JACOBSON et al., 2001). Estudos em camundongos Balb/c descreveram resultados satisfatórios da azitromicina quando utilizada no tratamento da toxoplasmose adquirida e reduz a mortalidade de camundongos infectados com cepas virulentas (DERGELI et al., 2003). A azitromicina é 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 (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Embora, os estudos demonstrem a eficácia da azitromicina, sozinha ou em conjunto com outras drogas, em indivíduos imunossuprimidos (WISELKA et al., 1996; JACOBSON et al., 2001), pouco se sabe sobre o papel do medicamento durante a infecção congênita.

1.10. Cepas de Toxoplasma

Estudos de genética sugerem que as cepas de *T. gondii* pertencem a três linhagens clonais principais, I, II, III (HOWE; SIBLEY, 1995), as quais diferenciam-se pela virulência e pelo padrão epidemiológico de ocorrência no hospedeiro. A maioria das cepas isoladas em indivíduos com AIDS na América do Norte é do tipo II. Os tipos I e II são recorrentes em pacientes com doenças congênitas (AJZENBERG et al., 2002). 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 e é

preferencialmente cistogênica (HOWE; SIBLEY, 1995). Recentemente foram descritas cepas “exóticas” (HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2004) que mais recentemente têm sido denominadas “recombinantes” (KHAN et al., 2007) de *T. gondii*, prevalentes particularmente na América do Sul as quais são associadas com a prevalência de toxoplasmose ocular (KHAN et al., 2006; VALLOCHI et al., 2005). 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 (CARME et al., 2002; JONES et al., 2006).

1.11 Calomys callosus

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

Estudos relacionando *C. callosus* a *Toxoplasma* evidenciaram que o roedor apresenta uma elevada susceptibilidade quando infectado pela cepa RH de *T. gondii* ocorrendo óbito no oitavo dia de infecção (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998). Entretanto, quando fêmeas prenhes são infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii* desenvolvem 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, nesse modelo, foi identificado que a passagem transplacentária do parasita acontece somente no intervalo de 10 dias antes da concepção, ou seja, durante a fase aguda da toxoplasmose materna. Quando a concepção ocorre 30 ou 50 dias após a inoculação parasitária (fase crônica da

toxoplasmose), há ausência de infecção fetal, demonstrando que, de forma semelhante ao que ocorre em humanos, não há transmissão vertical da toxoplasmose quando a mãe está em fase crônica (BARBOSA et al., 2007).

Diante da gravidade dos sintomas e da morbidade da toxoplasmose congênita, justifica-se a investigação de alternativas ao tratamento desta patologia.

OBJETIVOS

- Analisar a eficácia do tratamento com azitromicina em prevenir a transmissão vertical da toxoplasmose durante a gestação em modelo de *C. callosus*, tomando como parâmetro a incidência de infecção ocular nos fetos.
- Analisar o efeito do tratamento com azitromicina sobre a infecção sistêmica em fêmeas prenhas de *C. callosus* por *T. gondii*, através da análise de formas parasitárias em tecido encefálico.
- Analisar o efeito do tratamento com azitromicina sobre a infecção sistêmica em machos adultos de *C. callosus* por *T. gondii*, através da análise de formas parasitárias em tecido encefálico.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

C. callosus da linhagem Canabrava foram mantidos no biotério do Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, a temperatura ambiente controlada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) com água e comida *ad libitum*. Para o experimento de infecção adquirida foram utilizados 27 machos de *C. callosus*. Para os ensaios de infecção congênita, fêmeas virgens, soro-negativas para *T. gondii*, com idade entre 3 e 4 semanas foram acasaladas e checadas diariamente até o aparecimento de um tampão vaginal. Esse dia foi marcado como o primeiro dia de gestação. Os fetos obtidos foram seccionados longitudinalmente. Um olho foi utilizado para pesquisa de parasitas por imunohistoquímica e o outro para pesquisa do DNA dos parasitas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

2.2. Parasitas

A cepa ME49 foi mantida em encéfalo de *C. callosus* machos através da inoculação de 20 cistos de *T. gondii* em 0,5ml de solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS), 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 1 ml de PBS. O material foi lavado, por duas vezes, em 10 ml de PBS estéril submetido à centrifugação a 500xg por 10 minutos, em temperatura ambiente (TA). Após a ressuspensão em 1 ml de solução, foi feita a contagem de cistos pela adição de uma alíquota de 20 μl de suspensão colocada entre lâmina e lamínula (24x24mm) e observação em microscópio de luz na

objetiva de 10x. Determinada a contagem, uma dose de 500 µl da solução de 20 cistos em PBS foi administrada as fêmeas, no dia da verificação do tampão vaginal. Todos os animais foram inoculados via oral.

2.3. Tratamento

- **2.3.1-Fêmeas**

Devido à implantação embrionária em *C. callosus* ocorrer no quarto dia pós-concepção (FERRO; BEVILLACQUA, 1994), os tratamentos com azitromicina (300mg/Kg/dia) e controle (500µl de PBS/dia) iniciaram-se no quarto dia de gestação-infecção e foram estabelecidos de 24 em 24 horas. Como controle positivo de tratamento, grupos paralelos de fêmeas foram tratadas com sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (SPAf) mas, devido ao risco de teratogenicidade da pirimetamina, as fêmeas receberam o tratamento com essa associação de drogas a partir do 14ºdia de gestação. Nos dois primeiros dias de tratamento os animais receberam 100mg/Kg/dia de sulfadiazina (a cada 12 horas) e 50mg/Kg/dia pirimetamina de 12 em 12 horas e do terceiro dia até a data do sacrifício foi administrado 50mg/Kg/dia de sulfadiazina a cada 12 horas e 75mg/Kg/dia pirimetamina a cada 24 horas. Ao longo de todo o tratamento com SPAf, foi incorporado 15mg/Kg/dia de ácido folínico (a cada 24 horas) para evitar a supressão medular provocada pela pirimetamina. Todos os medicamentos foram administrados via oral.

As fêmeas de *C. callosus* infectadas com *T.gondii* no primeiro dia de fecundação foram divididas em 2 grupos e em 3 subgrupos de tratamento, cada qual contendo 9 fêmeas: um grupo controle (tratado somente com tampão salina-fostato (PBS), pH 7,2, 0,01M), um grupo tratado com azitromicina e outro tratado com a associação de

medicamentos - SPAf . Cada grupo foi, posteriormente, subdividido em 3, correspondentes aos dias de sacrifício (15º , 17º e 19º pós-infecção), contendo três fêmeas cada um.

Para estudo da infecção crônica, um outro grupo, contendo 9 fêmeas, foram infectadas logo após a verificação da rolha vaginal. Cada subgrupo de três fêmeas iniciou, no quarto dia de infecção, os respectivos tratamentos: azitromicina, SPAf e PBS. Depois de um período de 20 dias de infecção e fertilização, os tratamentos foram suspensos e as fêmeas foram sacrificadas 30 dias após.

Os olhos dos fetos de fêmeas sacrificadas no 15º, 17º e 19º foram coletados para análise imunohistológica e, o olho contralateral, para detecção molecular de *T. gondii*. Os cérebros dos dois grupos de fêmeas foram coletados e processados para imunohistoquímica.

- 2.3.2-Machos

Os machos de *C. callosus* seguiram o mesmo padrão de dosagem e tratamentos estabelecidos para as fêmeas. Dois grupos com 9 machos cada, foram subdivididos em três subgrupos contendo três animais para cada tipo de tratamento. Os tratamentos foram feitos como nos grupos de fêmeas prenhes, com os grupos controle e azitromicina recebendo tratamento a partir do quarto dia de infecção, enquanto o grupo tratado com SPAf recebeu medicação a partir do décimo quarto dia de infecção. O tratamento seguiu-se até completar 24 dias de infecção inóculo com *T. gondii*. Em um dos grupos, os nove machos foram sacrificados logo após o tratamento. No segundo grupo, após o término da medicação, os animais foram observados por mais 30 dias e, posteriormente, foram sacrificados. No terceiro grupo, todos os medicamentos, inclusive os do grupo SPAf, foram iniciados no 4º pós-infecção. O tratamento prolongou-se por 24 dias e os animais foram sacrificados após 54 dias de infecção.

2.4. Imunoperoxidase

Os cérebros maternos e os dos machos adultos foram fixados em formalina a 10% e desidratados posteriormente, em baterias de concentrações crescentes de álcool e xilol até a inclusão em parafina. Os tecidos seccionados em 4µm foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) com 3% de peróxido de hidrogênio para bloqueio da peroxidase endógena e, então, por 20 minutos a TA com 1% de soro de albumina bovina (BSA) para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida, os cortes foram incubados com soro policlonal de camundongo anti-*T. gondii*, *overnight* (ON), a 4°C, lavados e, posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário e o sistema ABC (sistema biotina-avidina) (Dako Cytomation LSAB®+System-HRP, Dako) com uma lavagem entre as duas etapas. Cada conjunto de reagentes foi incubado por 30 minutos a 37°C. A reação foi revelada com 3,3-diaminobenzidina tetrahydrocloreto (DAB, Sigma Chemical Co., USA). As amostras foram contra-coradas com hematoxilina de Meyer e examinadas ao microscópio óptico. Os resultados foram expressos como número de estruturas como cistos, número de vacúolos parasitóforos (WELTER et al., 2006) e parasitismo total (número de estruturas como cistos mais o número de vacúolos parasitóforos). Todas as contagens foram feitas em aumento de 400x.

2.5. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Para determinar a soroconversão dos animais infectados, as fêmeas e os machos de *C. callosus* tiveram sangue coletado via plexo orbital no dia da infecção por *Toxoplasma* e no dia de sacrifício. O sangue coletado foi centrifugado a 2000xg por 5 minutos e o soro retirado foi congelado a -20°. Poços de placas de poliestireno (Interlab, São Paulo, Brasil) foram recobertos com uma solução de antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) da cepa RH de concentração protéica de 10µg/mL em tampão carbonato de sódio (0,06M, pH 9,6) e as

placas foram incubadas deixando ON à temperatura de 4°C. Os poços foram lavados três vezes com PBST (PBS mais 0,01% de Tween 20) e incubados com as amostras de soro de *C. callosus* ou de camundongo Swiss (controle positivo), em duplicata, diluído 1:16 e 1:200, respectivamente, em PBST adicionado de Molico a 0,5%. Seguido de uma incubação de 1 hora à 37°C e uma série de seis lavagens em PBST, os poços foram incubados com o conjugado imunoenzimático contendo anticorpos anti- gama globulina de *C. callosus* ligados à peroxidase tipo IV (Sigma Chemical Co.) ou com anticorpo IgG de cabra anti-camundongo. Novamente outra incubação de 1 hora a 37°C repetindo-se o número de lavagens e a reação foi seguida pela revelação com o peróxido de hidrogênio (0,04%) e orto-fenilenediamina (0,5mg/mL) diluído em tampão fosfato-citrato (0,1M, pH 5,0). Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, a reação foi parada com o uso de 2N de NH_2SO_4 .

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405nm. Os níveis de anticorpos anti- *T. gondii* foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (EI), segundo a fórmula: $\text{IE} = \text{DO amostra} / \text{cut off}$, onde *cut off* foi calculado como a média da DO de soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Valores de $\text{IE} > 1,2$ foram considerados positivos para excluir valores de reatividade limítrofes próximos de $\text{IE} = 1,0$.

2.6. Quantificação da carga parasitária

Um dos olhos de todos os fetos com 19 dias de gestação e dos diferentes tratamentos foram removidos (35 amostras no total) para análise de carga parasitária através do PCR *real-time*. Os tecidos foram submetidos à extração de DNA utilizando-se o kit Wizard® SV Genomic DNA Purification (System, Promega, USA), segundo orientação

do fabricante. Ao final, o DNA foi eluído em 500µl de água livre de nucleases e mantido à -20°C. Para controle positivo da reação utilizou-se uma concentração de 10^5 e 10^7 parasitas e um globo ocular de *C. callosus* adulto não-infectado somado a 10^5 parasitas. O globo ocular de um animal não infectado foi utilizado como padrão negativo da reação.

- 2.6.1-Extração de DNA de *T. gondii* para construção da curva padrão

Dez camundongos Balb/c foram infectados, intraperitonealmente, com a cepa RH de *T.gondii* e, após dois dias de inóculo, foram sacrificados. O líquido peritoneal foi retirado utilizando salina estéril (0,9% de NaCl). O exsudato foi tratado com tampão de lise (cloreto de amônio, 0,16M e tampão Tris base à 0,17M), centrifugado e filtrado em filtros de 3µm (Millipore Co., EUA) obtendo-se parasitas purificados. Posteriormente, os parasitas foram centrifugados duas vezes a 2500xg por 10 minutos e depois diluídos a uma concentração de 1×10^7 e 1×10^5 parasitas/ ml. O material foi armazenado a -20°C até a realização do experimento.

- 2.6.2-Construção das curvas padrão

A curva padrão de *T. gondii* para as reações de PCR em tempo real foi gerada a partir da extração de DNA de tecido ocular de *C. callosus* ao qual foram adicionados 1×10^5 taquizoítas de *T. gondii*. A mistura foi diluída para uma concentração final de 100 ng de DNA total. As concentrações da curva variaram de 0,1 a 1000 parasitas, em diluições seriadas em base 10 para uma quantificação absoluta do parasita.

- 2.6.3-PCR em tempo real para determinação da carga parasitária

As reações de PCR em tempo real utilizadas para a quantificação de carga parasitária de *T. gondii* foram preparadas utilizando-se o SYBR Green PCR Master Mix

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) contendo 3 mM de $MgCl_2$, 200 μM de dATP, dCTP e dGTP, 400 μM de dUTP, 1,25 unidades de AmpliTaq GoldR DNA polimerase e 0,5 unidades de AmpEraseR uracil-N-glicosilase (UNG). Para a amplificação foram utilizados 10 μl de Sybr, 10 μl de DNA das amostras (50 ng), 0,5 μl de primer *sense* e 0,5 μl de primer *antisense*. As sequências do primer para a identificação do parasita foram: gene B1 (amplicon 50 pb) “Forward”: 5'-TTCAAGCAGCGTATTGTCGA-3' e “Reverse”: 5'-CATGAACGGATGCAGTTCCT – 3'. Para o controle endógeno usou-se uma sequência de β -actina (amplicon 100 pb) “Forward”: 5'- CCTAAGGCCAACCGTGAAAA -3' e “Reverse”: 5'- GAGGCATACAGGGACAGCACA-3'. Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 50°C por 2 minutos, seguida de 10 minutos a 95°C, para ativar a enzima AmpliTaq Gold. Seguiram-se 40 ciclos de incubação a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi testada em duplicata e todas as quantificações foram normalizadas em relação ao controle endógeno (β -actina). O gráfico foi gerado pelo “Data Analysis and Technical Graphics Origin 6.0”, Microcal Software.

2.7. Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa Graph Pad versão 4.0. As comparações foram determinadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e avaliação entre os grupos tratados e o controle pela análise de variância pelo teste de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

3.1. *Toxoplasma gondii* nos tecidos oculares dos fetos

Vinte e sete fêmeas divididas em três grupos de tratamentos chegaram aos períodos gestacionais desejados (15, 17 e 19 dias). Para cada grupo de tratamento e cada ponto de sacrifício foram escolhidos, aleatoriamente, dois fetos para análise dos tecidos oculares, dos quais um olho foi utilizado para imunohistoquímica e o olho contra-lateral para realização de PCR em tempo real. Pelo ensaio de imunoperoxidase os parasitas foram marcados e identificados nos animais tratados com veículo e com SPAf (Figura 2). Nenhum parasita foi identificado nos tecidos oculares dos fetos cujas mães foram tratadas com azitromicina (Tabela 1). Os dados são reforçados pela amplificação do gene de *T. gondii* somente nos tecidos oculares de fetos cujas mães foram tratadas com PBS ou SPAf (Figura 3). Nenhum dos fetos apresentou anormalidades anatômicas ou alterações morfológicas retinianas. Também não foram detectadas reações inflamatórias oculares (dados não mostrados).

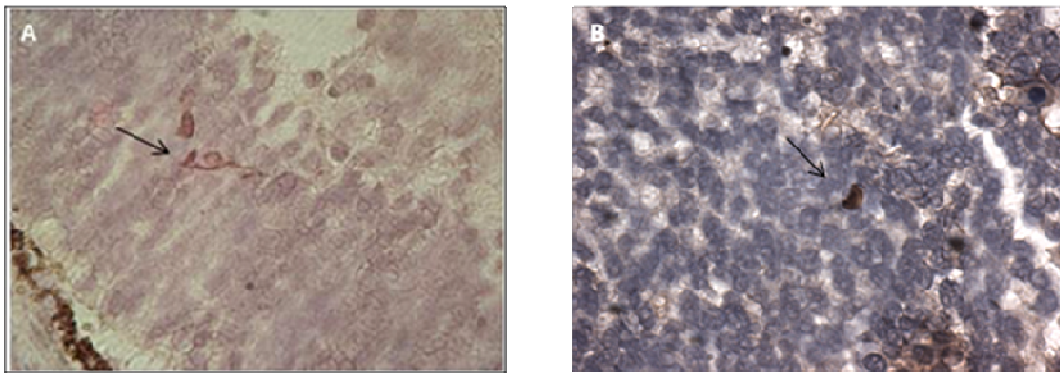


Figura 2: Vacúolos parasitóforos em tecido ocular de fetos de *C. callosus*, 1000x. **A:** Retina de feto com 19 dias de gestação cuja mãe foi tratada com SPAf (sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico). **B:** Retina de feto cuja mãe foi tratada com veículo.

Tabela 1: Número de vacúolos parasitóforos encontrado em olhos de fetos infectados com *Toxoplasma gondii* em diferentes grupos de tratamento ^a

Grupos de Tratamento	Idade fetal ^b		
	15	17	19
Controle (PBS)	0/6	1/6	2/6
SPAf ^c	5/6	1/6	2/6
Azitromicina	0/6	0/6	0/6

^a: Dois fetos foram analisados por ninhada para cada ponto gestacional. Três fêmeas foram usadas para cada data de sacrifício. Note que nenhum parasita foi observado nos tecidos oculares fetais do grupo tratado com azitromicina. A detecção dos parasitas foi realizada por imunohistoquímica.

^b: Dias de gestação

^c: SPAf = sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico

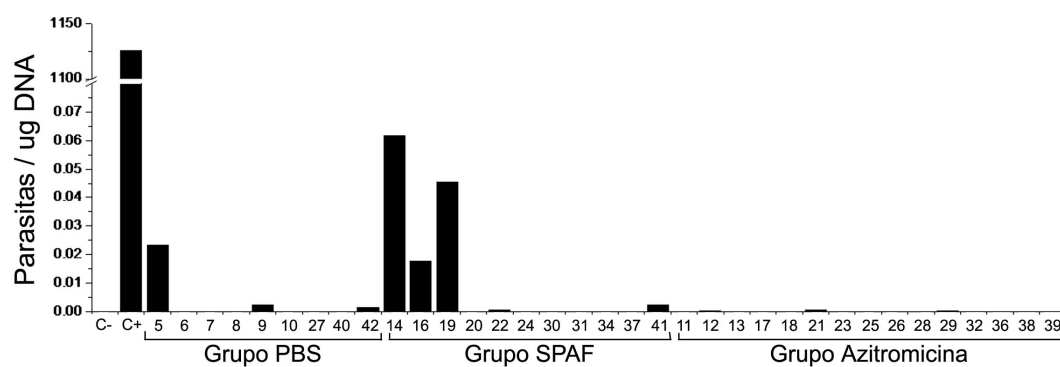


Figura 3: Quantificação de parasitas por PCR em tempo real em olhos de fetos. Observam-se somente traços de DNA do parasita em fetos cujas mães foram tratadas com azitromicina. As numerações são correspondentes ao número das amostras utilizadas. Total de 35 amostras.

3.2. Efeito do tratamento na infecção sistêmica das fêmeas prenhas

Para verificar a interferência dos diferentes tipos de tratamento sobre o parasitismo materno, os cérebros das fêmeas foram processados para análise por imunohistoquímica. No dia da fertilização, todas as fêmeas apresentaram sorologia negativa para *T. gondii*, enquanto que, no dia do sacrifício, todas apresentaram sorologia positiva. Nas fêmeas sacrificadas com 15 dias de gestação-infecção, não houve diferenças expressivas entre as três formas de análise (estruturas como cisto, número de vacúolos parasitóforos e parasitismo total) nas fêmeas tratadas com SPAf comparadas com o grupo controle e o tratado com azitromicina (Figura 4D-F). Entretanto, em todas as figuras demonstradas, a azitromicina aparenta reduzir a infecção (Figura 5A-C).

Um padrão similar é observado nas fêmeas tratadas até o 19º dia de gestação-infecção, com mais parasitas nos grupos controle e tratados com SPAf quando comparados ao grupo tratado com azitromicina (Figura 5G-I).

No 17º dia, o número de estruturas como cisto, de vacúolos parasitóforos e de parasitismo total foi expressivamente menor no grupo tratado com azitromicina do que no grupo tratado com SPAf. A quantidade de parasitas encontrados nos encéfalos das fêmeas grávidas foi maior neste último grupo de tratamento quando comparado ao grupo controle (Figura 5D-F) e (Figura 4A-B). O mesmo perfil é retratado na infecção cerebral das fêmeas tratadas até o 19º dia de gestação-inóculo (Figura 5G-H).

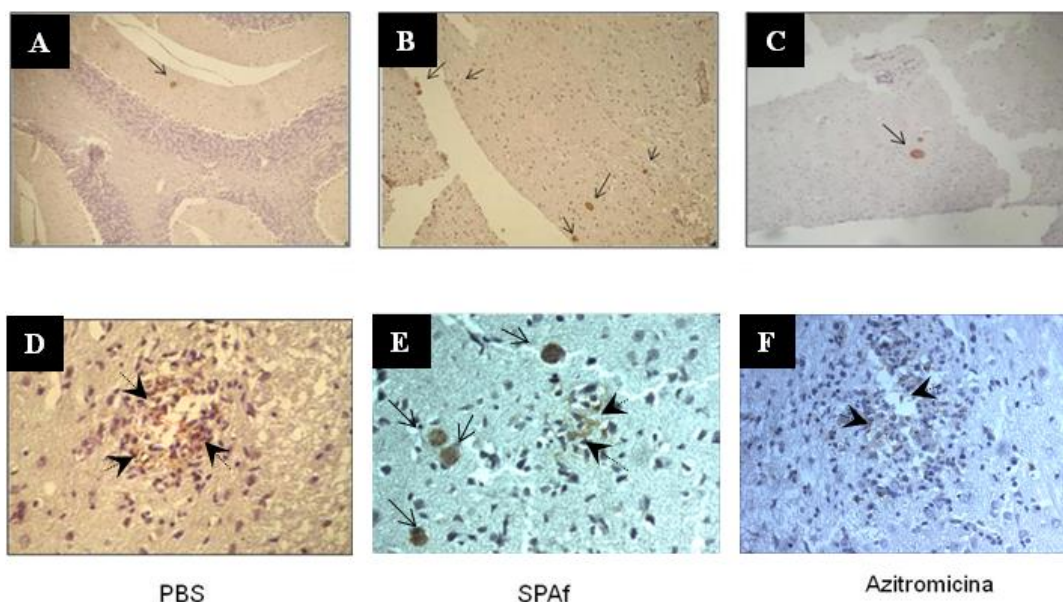


Figura 4: Infecção de *T. gondii* em encéfalo de fêmeas grávidas de *C. calomys*. **A:** Estrutura como cisto no encéfalo de fêmea tratada com PBS com 17 dias de gestação e inóculo. **B:** Estruturas como cistos no encéfalo de fêmea tratada com SPAf com 17 dias de gestação e inóculo e com 4 dias de tratamento. **C:** Estrutura semelhante a cisto em animal tratado com azitromicina com 17 dias de gestação-inóculo. **A, B e C:** setas longas, 100x. **D:** Vacúolos parasitóforos em encéfalo de fêmeas com 15 dias de gestação e infecção, tratadas com PBS. **E:** Vacúolos parasitóforos em encéfalo de fêmea com 15 dias de gestação e infecção, tratadas com SPAf. **F:** Vacúolos parasitóforos em encéfalo de fêmea com 15 dias de gestação e infecção, tratadas com azitromicina. **D, E e F:** vacúolos parasitóforos mostradas em cabeças de setas em negrito, 400x.

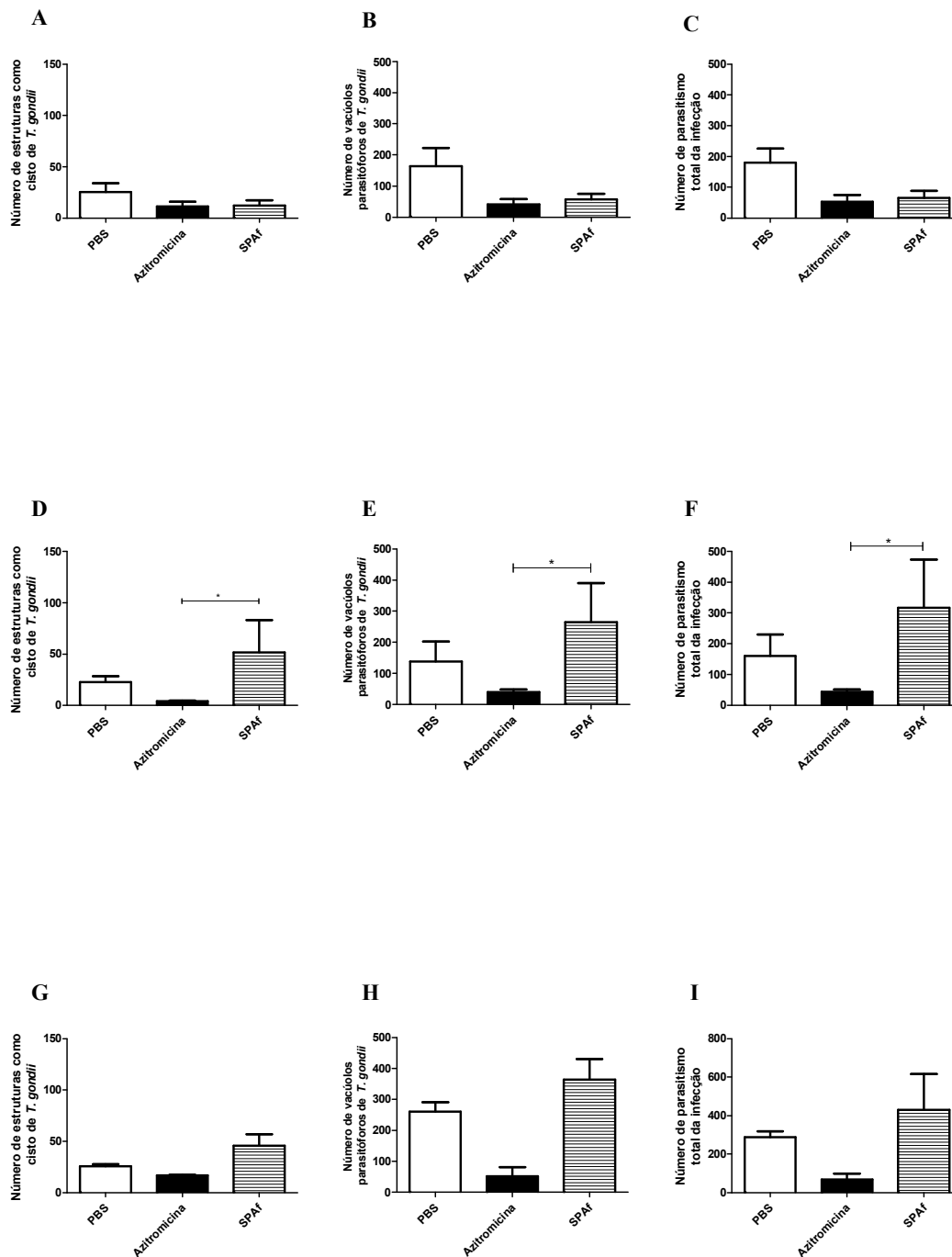


Figura 5: Detecção do parasitismo cerebral, por imunohistoquímica, de fêmeas grávidas de *C. callosus* infectados com *T. gondii* e tratados com PBS ou azitromicina ou SPAf. **A**, **B** e **C**: encéfalos coletados no 15º dia de infecção e gestação. **D**, **E** e **F**: cérebros coletados no 17º dia de infecção e gestação. **G**, **H** e **I**: encéfalo de fêmeas coletado no 19º dia de infecção e gestação. Três fêmeas foram usadas para cada grupo de tratamento. (*) $p < 0,05$.

3.3. Infecção crônica em fêmeas prenhes de *C. callosus*

Para criar parâmetro de comparação de tempo de tratamento sobre efeito parasiticida no grupo SPAf, um grupo de nove fêmeas, soronegativas para *T. gondii*, foram inoculadas com a cepa ME49 do parasita no mesmo dia da verificação de tampão vaginal.. Após quatro dias de infecção as fêmeas foram divididas em 3 subgrupos e foram tratadas com PBS ou azitromicina ou SPAf. O tratamento foi mantido por 24 dias após a infecção. As fêmeas foram sacrificadas após 30 dias de ausência medicamentosa e obtiveram os encéfalos removidos para análise imunohistológica. Os dados mostraram redução de todas as formas evolutivas do parasita analisada. A quantidade de estruturas como cistos apresentou uma significativa diminuição parasitária tanto nos grupos tratados com azitromicina ($p<0,0014$) quanto nos grupos tratados com SPAf ($p<0,0241$) (Figura 6A). Houve redução, também, no número de vacúolos parasitóforos nos indivíduos tratados com azitromicina e SPAf ($p<0,01$) (Figura 6B) assim como no numero de parasitismo total ($p<0,01$) (Figura 6C).

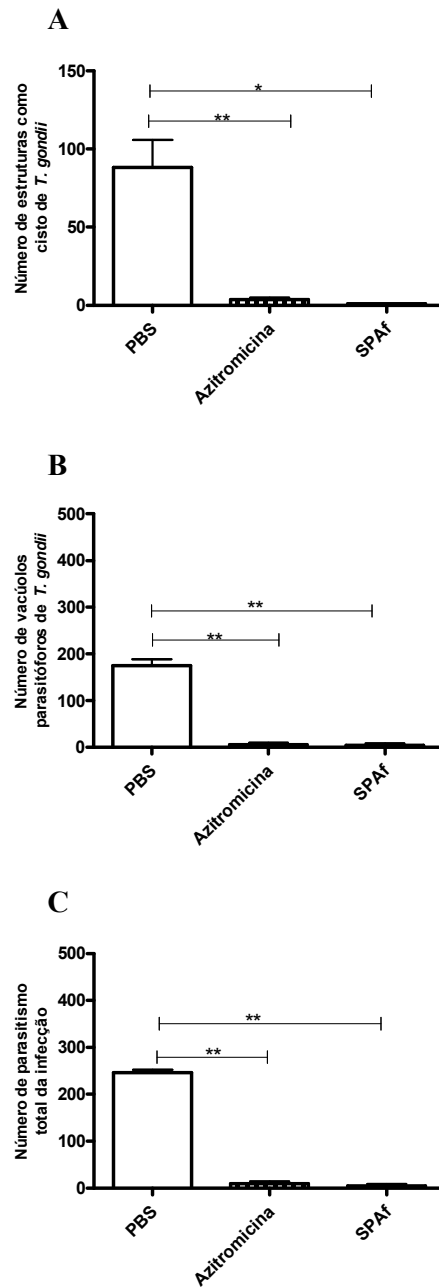


Figura 6: Encéfalo de fêmeas prenhes e com infecção crônica por *T. gondii*. Todos os tratamentos foram iniciados no quarto dia de fertilização e infecção. As drogas foram administradas por 20 dias. Os animais foram sacrificados 30 dias após o término das medicações. **A:** Número de estruturas semelhantes à cistos com $p < 0,05$. **B:** Número de vacúolos parasitóforos com $p < 0,01$. **C:** Parasitismo total de *T. gondii*, $p < 0,01$. Três fêmeas foram usadas para cada grupo de tratamento. (*) Diferença estatística pelo teste não-

paramétrico de Kruskal-Wallis com comparação entre os grupos (teste de Dunn). (**)
Diferença estatística pelo teste de análise de variância usando o teste de Dunnett.

3.4. Efeito do tratamento na infecção adquirida em machos imunocompetentes

3.4.1-Infecção cerebral em machos de *C. callosus* sacrificados logo após o término dos tratamentos

Machos de *C. callosus*, imunocompetentes, receberam a mesma dosagem padronizada às fêmeas e os tratamentos iniciaram-se no mesmo período para dois dos três grupos de machos – grupo veículo e grupo tratado com azitromicina (Figura 7A e 7C). Entretanto o tempo de tratamento foi estendido dos 19 dias (utilizado para as fêmeas grávidas) para 24 dias de infecção. Os machos tratados com veículo e sacrificados logo após o término do tratamento mostraram uma quantidade cística significativamente maior em relação aos tratados com azitromicina e SPAf ($p < 0,0132$) (Figura 8A). A quantidade de vacúolos parasitóforos nos animais tratados com veículo foi maior do que aqueles tratados com azitromicina ($p < 0,0439$). No parasitismo total, destaca-se a relevante diferença entre o grupo tratado com veículo e os grupos tratados com azitromicina e SPAf ($p < 0,0195$) (Figura 8C), embora não haja diferença entre os grupos tratados (Figura 8B-C).

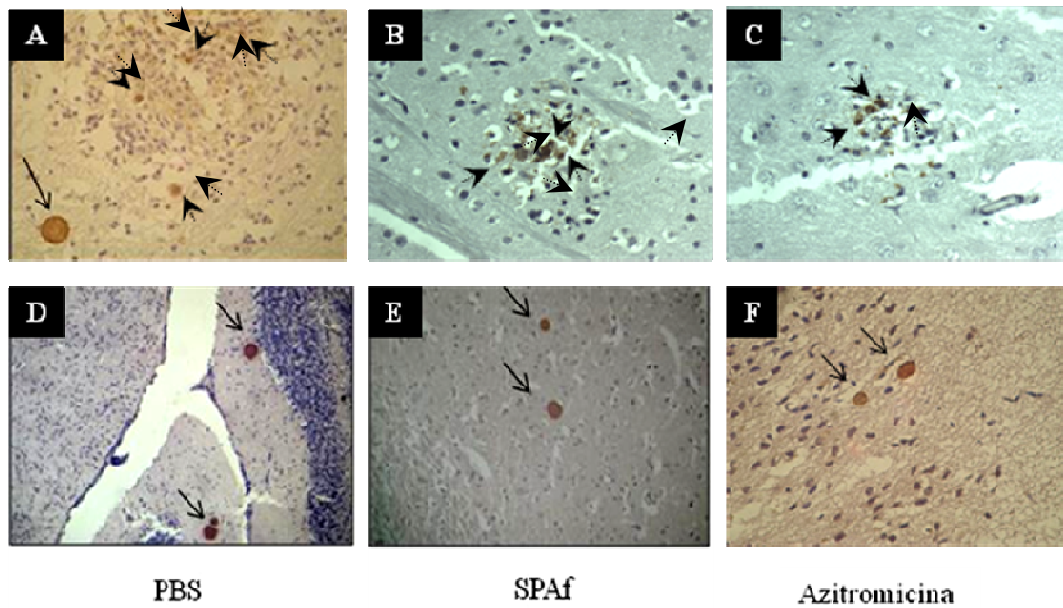


Figura 7: Infecção de *T. gondii* em encéfalo de machos adultos imunocompetentes. **A-C:** Vacúolos parasitóforos (cabeças de setas em negrito) de *T. gondii* de machos sacrificado logo após o tratamento com os diferentes medicamentos. Observe a presença de uma estrutura como cisto (seta longa) em A. Aumento de 400x. **D-F:** Estruturas semelhantes a cistos (setas) de *T. gondii* de encéfalo de machos sacrificados após 30 dias de abstinência de medicação. Observa-se um número gradualmente menor de estruturas semelhantes à cisto e de vacúolos parasitóforos com a utilização dos medicamentos. Aumento de 100x.

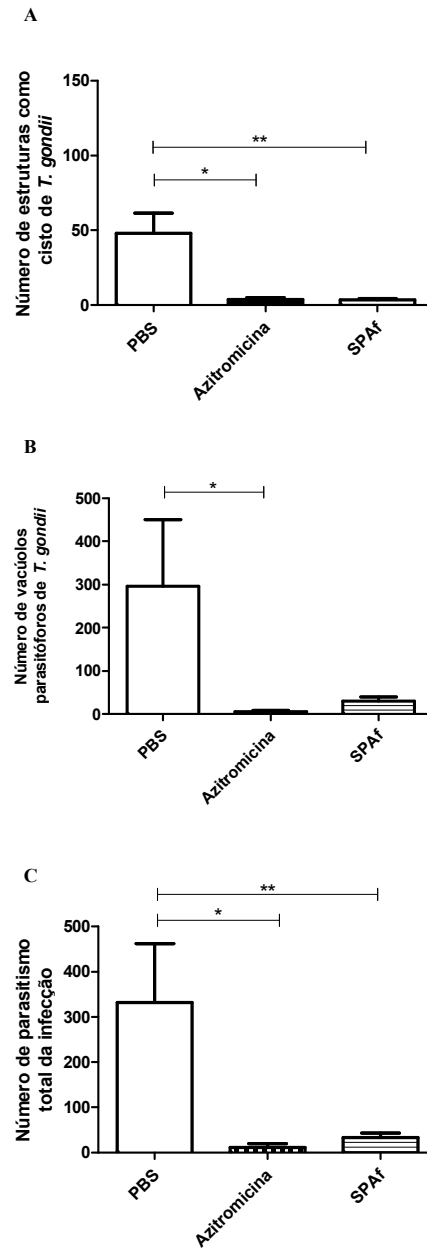


Figura 8: Infecção de *T. gondii* em cérebro de machos imunocompetentes de *C. callosus*. Os animais iniciaram as medicações em tempos diferentes (PBS e azitromicina no quarto dia após a infecção e SPAf no décimo quarto dia de infecção) e sacrificados logo após o tratamento (24 dias para os animais tratados com veículo ou com azitromicina e 10 dias para os tratados com SPAf). **A:** Número de estruturas como cisto de *T. gondii* com $p < 0,01$. **B:** Número de vacúolos parasitóforos com $p < 0,05$. **C:** Número total de parasitas com (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Três machos foram usados para cada grupo de tratamento. (*)

Diferença estatística pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com comparação entre os grupos (teste de Dunn). (**) Diferença estatística pelo teste de análise de variância usando o teste de Dunnett.

3.4.2-Infecção cerebral em machos de *C. callosus* sacrificados 30 dias após o término dos tratamentos

Nove machos imunocompetentes de *C. callosus*, divididos em três grupos, foram tratados com azitromicina e veículo após o quarto dia de infecção e os tratados com SPAf receberam a medicação a partir do 14º dia de infecção. Todos os machos foram tratados até o vigésimo quarto dia de infecção e permaneceram em observação por 30 dias sem administração das drogas. O número de estruturas semelhantes a cistos, vacúolos parasitóforos e parasitismo total entre o grupo tratado com PBS comparado aos tratados com azitromicina e SPAf foi significativamente maior ($p < 0,042$, $p < 0,022$ e $p < 0,034$, respectivamente) (Figura 9A-C) (Figura 7D-F). Os grupos tratados com azitromicina e SPAf obtiveram redução similar do número de estruturas como cisto (Figura 9A). Quando analisados a quantidade de vacúolos parasitóforos (Figura 9B) e o parasitismo total (Figura 9C), os resultados são semelhantes.

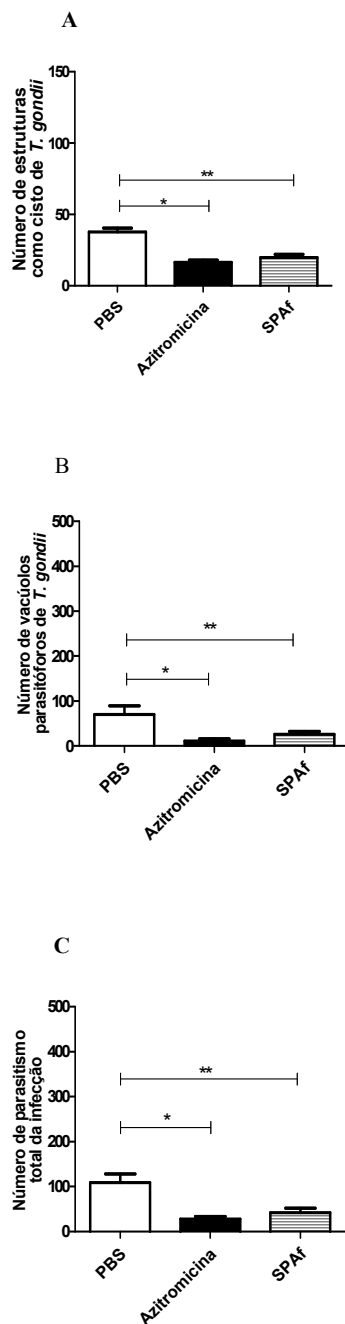


Figura 9: Infecção crônica de *T. gondii* em cérebro de machos de *C. callosus*. As medicações foram iniciadas em tempos diferentes (PBS e azitromicina no quarto dia após a infecção e SPAf no décimo quarto dia de infecção) e sacrificados após um período de 30 dias sem medicamento (somados 54 dias após a infecção por *T. gondii*). **A:** número de estruturas como cisto de *T. gondii*. **B:** Número de vacúolos parasitóforos. **C:** número total de parasitas. Três machos foram usados para cada grupo de tratamento. (*) Diferença

estatística pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com comparação entre os grupos (teste de Dunn). (**) Diferença estatística pelo teste de análise de variância usando o teste de Dunnett. Todos os valores obtidos foram significativos quando $p < 0,05$.

3.4.3. Infecção crônica por *T. gondii* no cérebro de *C. callosus* tratados pelo mesmo período

Nove machos, imunocompetentes, foram divididos e receberam a mesma dosagem de medicamento administrada descritos acima, exceto que todos os grupos iniciaram o tratamento no quarto dia. Após o 24º dia de infecção os tratamentos foram suspensos e os animais foram mantidos trinta dias sem medicamentos. A quantidade de estruturas como cisto foi expressivamente menor nos animais tratados com azitromicina do que no grupo controle ($p<0,011$) (Figura 10A). Resultado semelhante aconteceu com o número de vacúolos parasitóforos ($p<0,046$) (Figura 10B). A infectividade, em geral, apresentou-se bastante reduzida nos grupos tratados com azitromicina e com SPAf quando comparados àqueles que receberam somente veículo ($p<0,027$) (Figura 10C).

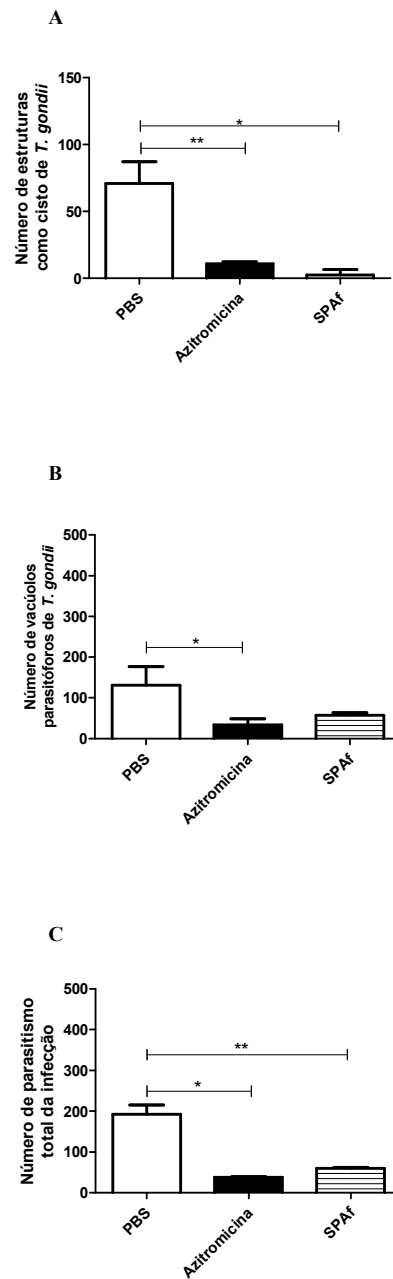


Figura 10: Infecção crônica de *T. gondii* em cérebro de machos de *C. callosus*. Todos os animais iniciaram as medicações no mesmo dia após a infecção (quarto dia após a infecção), obtiveram o mesmo período de tratamento (24 dias) e igual tempo de ausência das drogas (30 dias após o término da administração dos diferentes tratamentos). **A:** número de estruturas como cisto de *T. gondii* e $p < 0,01$. **B:** número de parasitas intracelular e $p < 0,05$. **C:** número total de parasitas e $p < 0,05$. Três machos foram usados para cada grupo de tratamento. (*) Diferença estatística pelo teste não-paramétrico de Kruskal-

Wallis com comparação entre os grupos (teste de Dunn). (**) Diferença estatística pelo teste de análise de variância usando o teste de Dunnett.

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 infecção fetal humana ocorre, em geral, quando a mãe é primo-infectada durante a gestação (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Embora, recentemente, tenham sido descritos casos isolados de reativação da toxoplasmose em mães soropositivas e imunocompetentes levando à toxoplasmose congênita (LEBAS et al., 2004). Semelhantemente a condição predominante em humanos, na espécie *Calomys callosus* não há infecção fetal se o contato com o parasita acontecer semanas antes da concepção e, caso ocorra, o parasita permanece retido no microambiente placentário (BARBOSA et al., 2007).

Nossos dados, por imunohistoquímica, demonstram um gradativo aumento nos parâmetros de infecção ocular dos fetos com o prolongar da gestação em fêmeas tratadas com veículo. Pereira e colaboradores (1999) demonstraram que fetos de mães contaminadas com a cepa ME-49 de *T. gondii*, sem tratamento, apresentaram formas císticas nos olhos entre o 15º e o 20º dia de gestação. Diferentemente, nossos dados evidenciaram somente parasitas em vacúolos parasitóforos. A escolha do 4º dia para o início dos tratamentos baseou-se nos dados obtidos por Ferro e Bevilaqua (1994), onde no quarto dia de gestação/inóculo ocorre a nidação do embrião ao endométrio. Devido aos efeitos teratogênicos provocados pela pirimetamina, a associação SPAf foi iniciada somente no décimo-quarto dia de gestação. Segundo dados de Ferro e colaboradores (2002), quando a inoculação dos parasitas é feita no primeiro dia de gestação, a infecção das células trofoblásticas ocorre a partir do 15º dia após o inóculo de *T. gondii*.

Dados de frequência de contaminação e de desenvolvimento da doença pelo *T. gondii* são variáveis e dependentes das áreas demográficas estudadas. Lopes e colaboradores (2007) demonstraram que, na infecção humana, dentre todas as mulheres soroconvertidas durante a primeira gestação, 61% não transmitem a doença para o feto, 26% apresentam sintomas subclínicos e 13% possuem a infecção clínica (LOPES et al., 2007). Em um estudo clássico, a frequência da doença subclínica em neonatos é acima de 85% (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Embora não haja um estudo direto sobre a frequência de transmissão fetal de *T. gondii* em modelos animais, nossos resultados demonstram que a passagem transplacentária foi de 30% no grupo controle.

Quando a primo-infecção por *Toxoplasma*, ocorre no primeiro trimestre de gestação os riscos de manifestar a forma grave da doença em fetos são maiores (REMYINGTON, 2001; GILBERT et al., 2003; MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Cerca de 10% dessas infecções terminam em abortos espontâneos ou em morte fetal (RORMAN et al., 2006). Atualmente, um número menor de neonatos e fetos apresenta toxoplasmose com sinais clínicos graves ao nascimento, talvez devido aos tratamentos preventivos com espiramicina e a associação de pirimetamina e sulfadiazina (CHRISTOPH et al., 2004). Entretanto, alguns estudos multicêntricos não questionam, somente, os efeitos positivos, mas também a eficiência da terapia pós-natal a longo prazo (CHRISTOPH et al., 2004, GRAS et al., 2001, FOULON et al., 1999).

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 - ou 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 (WALLON et al., 1999; JONES et al., 2003; GRAS et al.,

2001; RORMAN et al., 2006). A discordância é, principalmente, sobre a eficácia da pirimetamina e derivados de sulfadiazina em gestantes soroconvertidas, pois a análise é dificultada por envolver diferentes métodos de estudo, dificultando as comparações (WALLON et al., 1999). Além disso, a utilização tardia do medicamento após a décima oitava semana de gestação (REMINGTON, 2001, LOPES et al., 2007) implica na possibilidade de transmissão do parasita. Nesse estudo, o início tardio de administração de SPAf e o pouco tempo de tratamento (1 dia) nas fêmeas de *C. callosus* pode justificar a detecção de *T. gondii* nos olhos dos fetos de gestantes eutanasiadas no décimo quinto dia de prenhes (5 casos em 6 observados) semelhante ao do grupo não-tratado.

Dentre vários 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). Em experimentos murinos, a azitromicina foi capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos Balb/c infectados com a cepa RH de *T. gondii* (TABBARA et al., 2005) e vem demonstrando bons efeitos “*in vitro*” no combate a formas assexuadas de *Plasmodium falciparum* (NOELD, H. et al., 2007). Além disso, combinada com as formas tradicionais de tratamento da malária como, por exemplo, quinina-azitromicina a azitromicina mostra-se eficiente contra as formas resistentes da malária (NAKORNCHAI; KONTIANG, 2006). Em acordo com esses dados, nossos resultados mostraram que a azitromicina foi capaz de inibir a passagem parasitária para os tecidos oculares fetais, bem como de diminuir o número de parasitas no cérebro das mães.

A infecção congênita por *Toxoplasma* pode alcançar várias regiões oculares, sendo a seqüela mais grave a coriorretinite, que é recorrente nas infecções congênitas e os primeiros sintomas podem aparecer ao nascimento, nos primeiros anos de vida ou, mais tardiamente, dos 20 aos 30 anos de idade (RORMAN, et al. 2006). Dificilmente é diagnosticada na vida intrauterina. Nos fetos de *C. callosus* cujas mães foram tratadas com

azitromicina, não foram detectados parasitas nos tecidos oculares, ao contrário do observado nos grupos SPAf e controle, onde foi detectada infecção nesses tecidos em alguns fetos. Ressaltamos que o tempo de tratamento com SPAf foi somente de 1 dia em alguns dos subgrupos de SPAf. Dados de Pereira e colaboradores (1999) demonstraram a presença das formas bradizoítas nos olhos de embriões de *C. callosus* sem tratamento, sendo que no referido estudo as fêmeas foram infectadas no sétimo dia após o aparecimento da rolha vaginal.

A coriorretinite pode ser desencadeada pela própria atividade lítica do parasita. Alterações morfológicas na retina, edema e intenso infiltrado inflamatório foram encontradas nos olhos de fetos de camundongos C57BL/6 cujas mães foram infectadas com parasitas da cepa ME49, mas nenhum parasita foi localizado nas regiões afetadas (TEDESCO et al., 2007). De forma diferente, em nosso modelo não observamos reação inflamatória, entretanto detectamos os parasitas por métodos imunohistoquímicos e molecular. Em indivíduos adultos com retinites graves, o tratamento com azitromicina mostrou diminuir a reação inflamatória em torno das lesões (ROTHOVA et al., 1998). Araujo e colaboradores (1991b) demonstraram que a azitromicina possui um efeito sinérgico com o IFN- γ reduzindo a mortalidade em camundongos infectados com a cepa RH de *T. gondii*.

Durante a gestação, a imunidade, é radicalmente alterada (ERLEBACHER, 2001). Há uma pronunciada tendência para a redução de células T de perfil CD4⁺ e CD8⁺ com diminuição da secreção de IL-12 e IFN- γ , importantes no controle da toxoplasmose, (RAGHUPATHY, 2001) sugerindo a predominância do perfil humoral Th2 (ERLEBACHER, 2001; RAGHUPATHY, R., 2001). Aparentemente, o tratamento com SPAf não foi eficaz no controle da infecção materna, mas o tempo de tratamento variou de 1 a 5 dias. Quando fêmeas prenhes foram tratadas com SPAf ou azitromicina a partir do 4º

dia e sacrificadas após 30 dias do término dos tratamentos, nos dois grupos de tratamento houve redução semelhante do parasitismo cerebral, reforçando a hipótese de que a diferença observada entre os grupos com início de tratamento diferente seja devido ao tempo de exposição aos medicamentos. Ainda, nos machos tratados pelo mesmo período houve aparente controle da infecção, sem diferenças entre azitromicina e SPAf.

Em camundongos há uma tendência a aumentar o parasitismo em fêmeas (LIESENFELD et al., 2001). A infecção oral de parasitas da cepa ME49 foi capaz de promover maior mortalidade em fêmeas do que em machos de camundongos C57BL/6, infectados oralmente, as quais apresentavam maior número de parasitas intestinais. Administração de testosterona às fêmeas promoveu a diminuição da infecção e inflamação no íleo. Em nossos estudos, os machos apresentaram menor número de parasitas no cérebro quando comparados às fêmeas, independentemente do tratamento. Portanto, é provável que em *C. callosus* haja maior parasitismo nas fêmeas, o que explicaria parcialmente nossas observações. Outros fatores podem ter contribuído para tal resultado como, p. ex., variabilidade no número e viabilidade dos bradizoítas contidos nos cistos inoculados, como previamente sugeridos por Dubey (1998b).

Em nosso estudo, a azitromicina demonstrou eficácia no combate à toxoplasmose, assim como observados em outros modelos “*in vitro*” e “*in vivo*” (ARAÚJO et al., 1988; PFEFFERKORN; BOROTZ, 1994; CHANG et al., 1988, DEGERLI et al., 2003). Além da sua suposta atuação em ambos os estágios da infecção por *Toxoplasma*, possui a vantagem clínica de menores efeitos colaterais comparado com os fármacos utilizados, atualmente, no combate à doença (MARCHI et al., 1994; DEGERLI, 2003).

Contrariamente aos dados de Lescano e colaboradores (2004), a azitromicina, em nossos dados, conseguiu reduzir o número de estruturas semelhantes à cistos tanto nas fêmeas grávidas quando nos machos imunocompetentes de *C. callosus*. Essa diferença

pode ser devida ao início mais precoce do tratamento em nosso estudo, no quarto dia após a infecção, comparado ao 20º dia de infecção no estudo. Por outro lado, a administração da droga não foi capaz de eliminar completamente a fase cística da infecção “*in vivo*” como sugerido em outros trabalhos (DEROUIN, 1995; DERGELI et al., 2003). O mesmo foi relatado na infecção crônica de camundongos tratados com 100mg/kg/dia de azitromicina (LESCANO et al., 2004; DUMAS et al., 1994) ou da droga em associação com atovaquona (MOSHKANI; DALIMI, 2000).

A potente atividade da azitromicina contra *T. gondii* está na sua particularidade de se concentrar nos compartimentos acidificados das células (SCHWAB et al., 1994). Os parasitas do filo Apicomplexa possuem uma organela plastidial contendo um genoma de 35Kb (BORST et al., 1984). A função dessa nova organela ainda é não bem conhecida mas parece ser o alvo de drogas como a azitromicina. A concentração do antibiótico é mantido por um equilíbrio sutil de bases fracas entre os compartimentos neutros e acidificados da célula. Como o vacúolo parasitóforo de *T. gondii* não é um ambiente acidificado (SIBLEY et al., 1985), os parasitas intracelulares não ficam em contato direto com a droga. Experimento “*in vitro*” sugere que a absorção da droga pelo parasita ocorra na sua fase extracelular quando este está sujeito a maiores concentrações da azitromicina e, portanto, o antibiótico possuiria efeito a longo prazo (PFEFFERKORN; BOROTZ, 1994).

Em nosso estudo, o tratamento com azitromicina reduziu o número de estruturas como cistos em cérebros de *C. callosus* adultos (machos e fêmeas) que foram tratados por 11 a 15 dias para fêmeas sacrificadas no 15º ao 19º dias de gestação/infecção ou por 20 dias, para fêmeas onde foi induzida infecção crônica. Quando os animais tiveram tratamento iniciado no quarto dia de infecção, tanto a azitromicina quanto a combinação SPAf foram capazes de diminuir o parasitismo cerebral dos adultos de *C. callosus* indicando uma relação temporal de tratamento. Estudos indicam que o tratamento precoce

da toxoplasmose, na clínica, reduz a frequência e a severidade das seqüelas fetais onde a combinação da pirimetamina e sulfadiazina é utilizada (WONG; REMINGTON, 1994; GILBERT; STANFORD, 2000; GILBERT; GRAS, 2003). A diminuição do parasitismo nos encéfalos das fêmeas refletiu na eliminação do parasitismo ocular fetal já que foi encontrada uma pequena quantidade de estruturas como cisto nos encéfalos das fêmeas tratadas com azitromicina e ausência de parasitas nos tecidos oculares fetais.

A combinação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico, por sua vez, não é recomendada no início da gestação devido aos riscos teratogênicos acarretados ao feto (WALLON et al., 1999; REMINGTON et al., 2001; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Em contrapartida, o tratamento com a azitromicina nas fases iniciais da gestação não possui contra-indicações importantes (KORZENIOWSKI, 1995). Em estudo com pacientes aidéticos, sugere-se que a azitromicina poderia ser utilizada, inclusive, com fins terapêuticos (CHAVE et al., 1992) uma vez que a droga não possui efeitos colaterais significativos (KORZENIOWSKI, 1995) e é capaz de reduzir a carga parasitária de *T. gondii* (ARAUJO et al., 1988; CANTIN; CHAMBERLAND, 1993; BRAZ et al., 1999, DERGELI et al., 2003).

A azitromicina vem sendo usada, também, no tratamento da toxoplasmose adquirida ou na reativação em aidéticos. Relatos de caso demonstram a aplicabilidade da azitromicina como uma alternativa em casos de encefalite toxoplásmica em pacientes HIV-positivos (TROTТА et al., 1997; JACOBSON et al., 2001). Em machos adultos de *C. callosus*, a combinação de sulfadiazina e pirimetamina foi capaz de diminuir a carga parasitária quando comparada aos animais tratados com PBS, como seria esperado. A administração da azitromicina também foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de parasitas quando comparado ao controle.

Estudos apontaram que a azitromicina possui uma atividade significativamente superior a de outros antibióticos macrolídeos que estão sendo usados no tratamento da toxoplasmose em humanos (ARAÚJO et al., 1991a). Atualmente, a azitromicina vem sendo estudada em combinações: o efeito aditivo na associação de medicamentos como azitromicina e pirimetamina ou azitromicina e sulfadiazina tem dado bons resultados em ensaios murinos onde há maior rapidez no controle de *Toxoplasma* (CANTIN; CHAMBERLAND, 1993; BRAZ et al., 1999; LESCANO et al., 2004; TABBARA et al., 2005). Um estudo em humanos aponta a eficácia da azitromicina combinada à pirimetamina no tratamento da toxoplasmose ocular similar a do tratamento clássico da sulfadiazina e pirimetamina (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002).

Nosso estudo no modelo animal *C. callosus*, desta forma, contribui com a busca de tratamentos mais eficazes, que possam vir a ser testados posteriormente em ensaios clínicos para confirmar se, em humanos, a azitromicina será eficaz para diminuir a transmissão vertical da toxoplasmose e, assim, evitando seqüelas graves ao neonato, bem como para o tratamento de indivíduos que apresentem intolerância ou resposta alérgica aos medicamentos usados correntemente para o tratamento da toxoplasmose. Atualmente, a azitromicina demonstra ter significativo efeito terapêutico, com pouco efeito colateral e ser bem tolerada em crianças com toxoplasmose congênita (CHEN et al., 2004). Nosso trabalho, portanto, é o primeiro a demonstrar a eficiência da azitromicina na diminuição transmissão vertical da toxoplasmose, medida através da redução da infecção ocular no modelo animal *C. callosus*.

CONCLUSÕES

- A azitromicina demonstrou ser eficaz para diminuir a transmissão vertical da toxoplasmose durante a gestação em modelo de *C. callosus*, tomando como parâmetro a diminuição significativa de infecção ocular nos fetos em relação ao grupo controle.
- A azitromicina demonstrou também efeito terapêutico satisfatório no tratamento de fêmeas prenhas de *C. callosus* infectadas por *T. gondii*, através da diminuição significativa do parasitismo cerebral em relação ao grupo controle.
- A azitromicina demonstrou também efeito terapêutico satisfatório no tratamento de machos adultos de *C. callosus* infectados por *T. gondii*, através da diminuição significativa do parasitismo cerebral em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJZENBERG, D., BAÑULS, A.L., SU, C., DUMÈTRE, A., DEMAR, M., CARME, B., DARDÉ, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.34, n. 10, p.1185–1196, 2004.
- AJZENBERG, D., COGNÉ, N., PARIS, L., BESSIÈRES, M.H., THULLIEZ, P., FILISETTI, D., PELLOUX, H., MARTY, P., DARDÉ, M.L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, n.5, p.684-689, 2002.
- ALLEGRA, C.J., KOVACS, J.A., DRAKE, J., SWAN, J.C., CHABNER, B.A., MASUR, H. Potent in vitro and in vivo antitoxoplasma activity of the lipid-soluble antifolate trimetrexate. **The Journal of Clinical Investigation**, v.79, n.2, p. 478-482, 1987.
- ARAUJO, F.G., REMINGTON, J.S. Synergistic activity of azithromycin and gamma interferon in murine toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, n.8, p.1672-1673, 1991b.
- ARAUJO, F.G., SHEPARD, R.M., REMINGTON, J.S. *In vivo* activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10, n.6, p.519-524, 1991a.
- ARAUJO, F.G.; GUPTILL, D.R.; REMINGTON, J.S. Azithromycin, a macrolide antibiotic with potent activity against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 5, p. 755-757, 1988.

- BARBOSA, B.F., SILVA, D.A., COSTA, I.N., PENA, J.D., MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, n.7, p.624-630, 2007.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n.9., p. 426-430, 2003.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, v.195, n.12, p. 1625-1633, 2002.
- BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 607-623, 2000.
- BLAIS, J., BEAUCHAMP, D., CHAMBERLAND, S. Azithromycin uptake and intracellular accumulation by *Toxoplasma gondii* infected mouse macrophages. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, n. 3, p.371-382, 1994.
- BLAIS. J., GARNEAU, V., CHAMBERLAND, S. Inhibition of *Toxoplasma gondii* protein synthesis by azithromycin. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.37, n.8., p.1701-1703, 1993.
- BORST, P., OVERDULVE, J.P., WEIJERS, P.J., FASE-FOWLER, F., VAN DER BERG, M. DNA circles with cruciforms from *Isospora (Toxoplasma) gondii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 781, p.100-111, 1984.
- BOSCH-DRIESSEN, L.H., VERBRAAK, F.D., SUTTORP-SCHULTEN, M.S., VAN RUYVEN, R.L., KLOK, A.M., HOYNG, C.B., ROTHOVA, A. A prospective, randomized trial of pyrimethamine and sulphadiazine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 134, n.1, p. 34-40. 2002.

BRAZ, L. M. A.; DI PIETRO, A. O., AMATO NETO, V., FRANÇA, F. O. S. The evaluation of the efficacy of azithromycin and pyrimethamine used alone or in combination in the treatment of an experimental infection in mice by *Toxoplasma gondii*. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 401-403, 1999.

CANTIN, L., CHAMBERLAND, S. *In vitro* evaluation of the activities of azithromycin alone and combined with pyrimethamine against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n.9, p.1993-1996, 1993.

CARME, B., BISSUEL, F., AJZENBERG, D., BOUYNE, R., AZNAR, C., DEMAR, M., BICHAT, S., LOUVEL, D., BOURBIGOT, A.M., PENEAU, C., NERON, P., DARDE, M.L. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4037-4044, 2002.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, n.2, 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.

CHAVE, J.P., MUNAFO, A., CHATTON, J.Y., DAYER, P., GLAUSER, M.P., BIOLLAZ, J. Once-a-week azithromycin in AIDS patients: tolerability, kinetics, and effects on zidovudine disposition. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, n.5, p.1013-1018, 1992.

CHEN, G.F., FANG, Y.H., GUO, D.X., FENG, X.W., XIANG, W., RUAN, H.Q.
Follow up of 16 cases with congenital toxoplasmosis treated with azithromycin.
Zhonghua er ze za zhi, v.42, n.1, p. 23-25, 2004.

CHOWDHURY, M. Toxoplasmosis: a review. **Journal of Medicine**, v.17, p.373-396,
1986.

CHRISTOPH, J., KATTNER, E., SEITZ, H.M., REITER-OWONA, I. Strategies for
the diagnosis and treatment of prenatal toxoplasmosis - a survey. **Zeitschrift fur
Geburtshilfe und Neonatologie**, v. 208, n.1, p.10-16, 2004.

DEGERLI, K.; KILIMCIOUGLU, A.A.; KURT, O.; TAMAY, T.; OZBILGIN, A.
Efficacy of azithromycin in murine toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma
gondii* strain from Turkey. **Acta Tropica**, v.88, n.1, p. 45-50, 2003.

DEROUIN, F. New pathogens and mode of action of azithromycin: *Toxoplasma
gondii*. **Pathologie-biologie**. v.43, n.6, p.561-564, 1995.

DEROUIN, F., CHASTANG, C. *In vitro* effects of folate inhibitors on *Toxoplasma
gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, n.10, p.1753-1759, 1989.

DEROUIN, F.; SANTILLANA-HAYAT, M. Anti-toxoplasma activities of
antiretroviral drugs and interactions with pyrimethamine and sulfadiazine *in vitro*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 44, n.9, p.2575-2577, 2000.

DESMONTS, G., COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of
378 pregnancy. **The New England Journal of Medicine**, v.290, n. 20, p.1110-1116,
1974.

DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O., NIKOLIĆ, A., BOBIĆ, B., KLUN, I., ALEKSIĆ, A.
Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with
atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. **Microbes and Infection**, v.7, n.1, p.49-
54, 2005.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n.7, p. 1019-1024, 1998a.

DUBEY, J.P. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n.6, p. 1279-1282, 1998b.

DUMAS, J.L., CHANG, R., MERMILLOD, B., PIGUET, P.F., COMTE, R., PECHÉRE, J.C. Evaluation of the efficacy of prolonged administration of azithromycin in a murine model of chronic toxoplasmosis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.34, n.1, p. 111-118, 1994.

ERLEBACHER, A. Why isn't the fetus rejected? **Currents Opinion in Immunology**, v. 13, n.5, p. 590-593, 2001.

EYLES, D.E., COLEMAN, N. An evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine, alone and in combination, on experimental mouse toxoplasmosis. **Antibiotic and Chemotherapy**, v. 5, p.529-539, 1955.

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.

FERNANDES, N.E., CRAVOS, P., DO ROSÁRIO, V.E. Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Maputo, Mozambique: presence of mutations in the *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.4, p.447-450, 2007.

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. **Parasitology Research**, v. 85, p. 647- 654, 1999.

FERRO, E.A., BEVILACQUA, E. Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Journal of Morphology**, v.221, n.2, p.139-152, 1994.

FERRO, E.A.; SILVA, D.A., 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 parasites. **Nature**, v.390, p. 407-409, 1997.

FOULON, W., VILLENA, I., STRAY-PEDERSEN, B., DECOSTER, A., LAPPALAINEN, M., PINON, J.M., JENUM, P.A., HEDMAN, K., NAESSENS, A. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v.180, p.410-415, 1999.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n.3, p. 167-170, 2006.

FUNG, H.B., KIRSCHENBAUN, H.L. Treatment regimens for patients with toxoplasmic encephalitis. **Clinical Therapeutics**, v.18, n.6, p.1037-1056, 1996.

GADDI, P.J., YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunology and Cell Biology**, v.85, n.2, p.155-159, 2007.

GARIN, J.P., PELLERAT, J., MAILLARD, M, WOEHRLE-HEZEZ, R. Theoretical basis of the prevention of congenital toxoplasmosis in pregnant women by spiramycin. **Lyon Médical**, v.221, n. 1, p.21-25, 1969.

GILBERT, R. E., STANFORD, M.R. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? **The British Journal of Ophthalmology**, v. 84, n.2, p. 224-226, 2000.

GILBERT, R., GRAS, L., EUROPEAN MULTICENTRE STUDY ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS. Effect of timing of treatment on the risk of mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*. **An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.110, n.2, p.112-120, 2003.

GLADUE, R.P., SNIDER, M.E. Intracellular accumulation of azithromycin by cultured human fibroblasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n.6, p.1056-1060, 1990.

GOMES, U.A.; TERMEL, J.R.; FERRIOLI – FILHO, F.; NOGUEIRA, J.L. Incidence of *Toxoplasma gondii* infections in rural and urban areas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 17, n.6, p. 355-360, 1975.

GROSSMAN, P.L., REMINGTON, J.S. The effect of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n.3, p.445-455, 1979.

GRASS, L., GILBERT, R.E., ADES, A.E., DUNN, D.T. Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis. **International Journal of Epidemiology**, 30, n.6, p.1309-1313, 2001.

GRUJIĆ, J., DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O., NIKOLIĆ, A., KLUN, I., BOBIĆ, B. Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n.3, p.226-230, 2005.

GUERINA, N.G., HSU, H.W., MEISSNER, H.C., MAGUIRE, J.H., LYNNFIELD, R., STECHENBERG, B., ABROMS, I., PASTERNAK, M.S., HOFF, R., EATON, R.B., GRADY, G.F. New England Regional *Toxoplasma* Working Group. Neonatal

serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection.

The New England Journal of Medicine, v.330, p.1858-1863, 1994.

HAMILL, R. J. Role of fibronectin in infective endocarditis. **Review of Infectious Diseases**, v. 9, suppl.4, p.360-371, 1987.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n.6, p. 973-988, 2003.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. **American Journal of Ophthalmology**, v. 137, n.1, p. 1-17, 2004.

HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.172, n.6, p.1561-1566, 1995.

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.

JANKÚ, J. Pathogenesa a Pathologická Anatomie. Vrozeného Kolobomu Zlute Skurny Oku Normál ne Velikém a Mikrophtalmicken s Nálezem Parasitu v Sitnici. **Cās Lék Ces**, v.62, p.1021-1027, 1923.

JOHANNESSEN, J.K., CHRISTIANSEN, I., SCHMIDT, D.R., PETERSEN, E., HANSEN, S.H. Simultaneous determination of pyrimethamine, sulphadiazine and N-acetyl-sulfadiazine in plasma for monitoring infants in treatment of congenital toxoplasmosis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n.5, p. 1093-1098, 2005.

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.

JONES, L.A., ALEXANDER, J., ROBERTS, C.W. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. **Parasite Immunology**, v.28, p. 635-642, 2006.

KHAN A, JORDAN C, MUCCIOLI C, VALLOCHI AL, RIZZO LV, BELFORT R, JR., VITOR RW, SILVEIRA C, SIBLEY LD. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KOPPE, J.G., LOEWER-SIEGER, D.H., DE ROEVER-BONNET, H. Results of 20-years follow-up of congenital toxoplasmosis. **Lancet**, v. 1, n. 8475, p.254-256, 1986.

KORZENIOWSKI, O.M. Antibacterial agents in pregnancy. **Infectious Disease Clinics in North of American**, v.9, n.3, p.639-651, 1995.

KRAVETZ, J.D., FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **American Journal of Medicine**, v.118, n.3, p.212-216, 2005.

LEBAS, F., DUCROCQ, S., MUCIGNAT, V., PARIS, L., MÉGIER, P., BAUDON, J.J., GOLD, F. Congenital toxoplasmosis: a new case of infection during pregnancy in an previously immunized and immunocompetent woman. **Archives de Pédiatrie**, v.11, n.8, p.926-928, 2004.

LEBECH, M., ANDERSEN, O., CHRISTENSEN, N.C., NIELSEN, H.E., PEITERSEN, B., RECHNITZER, C., LARSEN, S.O., NORGAARD-PEDERSEN, B., PETERSEN, E. Feasibility of neonatal screening for *Toxoplasma* infection in the absence of prenatal treatment. **Lancet**, v. 353, p.1834-1837, 1999.

- 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.
- LIESENFELD, O., NGUYEN, T.A., PHARKE, C. SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *The Journal of Parasitology*, v. 87, n.6, p.1491-1493, 2001.
- LOPES, F.M., GONÇALVES, D.D., MITSUKA-BREGANÓ, R., FREIRE, R.L., NAVARRO, I.T. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, v.11, n.5, p.496-506, 2007.
- LYONS, R.E., McLEOD, R., ROBERTS, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v.18, n.5, p.198-201, 2002.
- MARCHI, M.; VACONDIO, R.; BAGNULO, A.; MENGOLI, M. Azithromycin-omeprazole. Treatment for eradication of *Helicobacter pylori*. **Minerva Gastroenterologica e Dietologica**, v.40, n. 1, p. 47-49, 1994.
- MENECEUR, P., BOULDOUYRE, M.A., AUBERT, D., VILLENA, I., MENOTL, J., SAUVAGE, V, GARIN, J.F., DEROUIN, F. *Toxoplasma godii: In Vitro* susceptibility of various genotypic strains to pyrimethamine, sulfadiazine and atovaquone. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 2008, in press.

- MINEO, J.R., CAMARGO, M.E., FERREIRA, A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v.27, n.2, p. 283-287, 1980.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MOSHKANI, S.K., DALIMI, A. Evaluation of the efficacy of atovaquone alone or in combination with azithromycin against acute murine toxoplasmosis. **Veterinary Research Communications**, v.24, n.3, p.169-177, 2000.
- NAKORNCHAI, S., KONTHIANG, P. Activity of azithromycin or erythromycin in combination with antimalarial drugs against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Acta Tropica**, v.100, n.3, p.18-192, 2006.
- 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., FERRO, E. A., MINEO, J. R. Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n.1, p. 103-114, 1999.
- PFEFFERKORN, E.R., BOROTZ, S.E. Comparison of mutants of *Toxoplasma gondii* selected for resistance to azithromycin, spiramycin, or clindamicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n.1, p. 31-37, 1994.
- PHILLIPS-HOWARD, P.A., WEST, L.J. Serious adverse drug reactions to pyrimethamine-sulphadoxine, pyrimethamine-dapsone and amodiaquine in Britain. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, n.2, p.82-85, 1990.
- RAGHUPATHY R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars in Immunology**, v.13, n.4, p.219-227, 2001.

REEVES, D.S., BROUGHALL, J.M., HOLT, H.A., VERGIN, H. Pharmacokinetics of tetroxoprim and sulphadiazine in human volunteers. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.5, p.119-138, 1979.

REMYINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONT, G. In: **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 5.ed. Toxoplasmosis, 2001., cap. 5, p. 205-345.

REYNOLDS, M. G., OH, J., ROOS, D.S. *In vitro* generation of novel pyrimethamine resistance mutation in the *Toxoplasma gondii* dihydrofolate reductase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.4, p.1271-1277, 2001.

REYNOLDS, M. G., ROOS, D.S. A biochemical and genetic model for parasite resistance to antifolates. *Toxoplasma gondii* provides insights into pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n.6, p.3461-3469, 1998.

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEM-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n.4, p. 458-472, 2006.

ROTHOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **The British Journal of Ophthalmology**, v.77, n.6, p. 371-377, 1993.

ROTHOVA, A., BOSCH-DRIESSEN, L.E., VAN LOON, N.H., TREFFERS, W.F. Azithromycin for ocular toxoplasmosis. **The British Journal of Ophthalmology**, v.82, n.11, p. 1306-1308, 1998.

RUSSO, M.; PERGOLA, G.; PERDICINI, G. Ocular toxoplasmosis: our experience. **Le Infezioni in Medicina**, v.13, n. 3, p. 160-167, 2005.

SCHMIDT, D.R., HOGH, B., ANDERSEN, O., HANSEN, S.H., DALHOFF, K., PETERSEN, E. Treatment of infants with congenital toxoplasmosis: tolerability and plasma concentrations of sulfadiazine and pyrimethamine. **European Journal of Pediatrics**, v.165, n.1, p. 19-25, 2006.

SCHOONDERMARK-VAN DE VEN, E., MELCHERS, W, CAMPS, W., ESKES, T., MEUWISSEN, J., GALAMA, J. Effectiveness of spiramycin for treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in Rhesus monkeys. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.38, n.9, p. 1930-1936, 1994.

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.

SEGUNDO, G.R.S.; SILVA, D.A., MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brasil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p. 13-17, 2004.

SIBLEY, L.D., WEIDNER, E., KRAHENBUHL, J.L. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v.315 p.416-419, 1985.

SILVA, N.M.; GAZZINELLI, R.T; SILVA, D.A.; FERRO, E.A.; KASPER, L.H.; MINEO, J.R. Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during in vivo conversion of bradyzoites to tachyzoites. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3959-3963, 1998.

SUZUKI, Y. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.234-240, 2002.

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.

TABBARA, K.F., HAMMOUDA, E., TAWFIK, A., AL-OMAR, O.M., ABU EL-ASRAR, A.M. Azithromycin prophylaxis and treatment of murine toxoplasmosis. **Saudi Medical Journal**, v.26, n.3, p.393-397, 2005.

TEDESCO, R.C., VITOR, R.W., BRANDÃO, G.P., CALABRESE, K.S. Ocular toxoplasmosis signs in mice embryo. **Micron**, v.38, n.7, p.729-733, 2007.

TROTTA, M., STERRANTINO, G., MILO, D., DRANÍSIO, D., LEONCINI, F. Azithromycin combined with pyrimethamine in the treatment of neurotoxoplasmosis, in an AIDs patient. **Minerva Medica**, 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.

WALLON, M., LIOU, C., GARNER, P., PEYRON, F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **BMJ**, v.318, p.1511-1514, 1999.

WELTER, A., MINEO, J.R., SILVA, D.A., LOURENÇO, E.V., FERRO, E.A., ROQUE-BARREIRA, M.C., DA SILVA, N.M. An opposite role is exerted by the acarina *Myocoptes musculus* in the outcome of *Toxoplasma gondii* infection

according to the route of the protozoa inoculation. **Microbes and Infection**, v. 8, n.11, p. 2618-2628, 2006.

WILDER, H.C. *Toxoplasma* chorioretinitis in adults. **A.M.A. Archives of Ophthalmology**, v. 48, n.2, p.127-136, 1952.

WISELKA, M. J, READ., R, FINCH, R. G. Response to oral and intravenous azithromycin in a patient with toxoplasma encephalitis and AIDS. **The Journal of Infection**, v.33, n.3, p.227-229, 1996.

WONG, S.Y., REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical Infectious and Disease**, v.18, n.6, p. 853-862, 1994.