

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise da eficiência da associação dos fármacos (sulfadiazina,
pirimetamina e ácido folínico) no tratamento da toxoplasmose congênita
experimental em *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae)**

Lorena de Almeida Santana

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

Uberlândia - MG
Setembro - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise da eficiência da associação dos fármacos (sulfadiazina,
pirimetamina e ácido folínico) no tratamento da toxoplasmose congênita
experimental em *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae)**

Lorena de Almeida Santana

Profª Drª Eloisa Amália Vieira Ferro

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

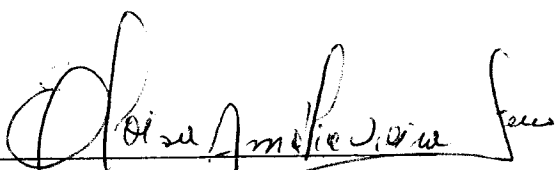
Uberlândia - MG
Setembro - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

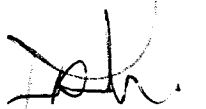
**Análise da eficiência da associação dos fármacos (sulfadiazina,
pirimetamina e ácido folínico) no tratamento da toxoplasmose congênita
experimental em *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae)**

Lorena de Almeida Santana

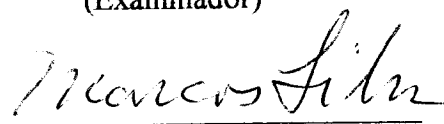
Aprovado pela Banca Examinadora em 15/09/06 Nota 100,0



Profª Drª Eloisa Amália Vieira Ferro
(Nato da Banca Examinadora)



Profª Dr José Roberto Mineo
(Examinador)



Profª Dr Marcos Silva
(Examinador)

Uberlândia, 23 de setembro de 2006.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a Deus pela grandiosidade do amor que tem por mim e por colocar as pessoas e oportunidades certas nos momentos exatos de minha vida. Obrigada Senhor!

Agradeço ainda àqueles que me auxiliaram na sustentação de meus sonhos e desejos, e independente de nossas naturais diferenças sei que tenho em vocês um lugar seguro para voltar sempre, minha FAMÍLIA, aos meus pais Walter e Edna e minha querida irmã Lara.

E a você meu esposo Luciano, que aprendeu e aprende a conviver comigo, me compreendendo e respeitando... tentando acertar sempre, obrigada por tudo meu amigo.

“A terra produz fruto por si mesma: primeiro aparecem as folhas, depois a espiga e, por fim, os grãos enchem a espiga. Quando as espigas estão maduras, o homem corta com a foice, porque o tempo da colheita chegou.” (Mc 4, 28-29)

DEDICATÓRIA

À Profª Drª Eloisa Amália Vieira Ferro,

À minha família agradeço o dom da vida e o natural amor que tem por mim. Mas pela conclusão desse trabalho agradeço a você, que com sua altivez, sabedoria e capacidade de tomada de decisões, me mostrou a profissional competente e dedicada que é.

Seria muito mais fácil se você fosse apenas orientadora, mas você é, e faz questão de ser, amiga, companheira, mãe, madrinha... E dessa forma fica impossível não gostar mais de você do que deveria.

Esse trabalho é uma realização pessoal minha, porém a conquista é nossa, por isso é dedicado a você.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof^o Dr José Roberto Mineo por ter se mostrado tão solícito, ajudando com sua competência profissional em momentos tão decisivos, com sugestões extremamente pertinentes e enriquecedoras;
- À Prof^a Deise Aparecida de Oliveira Silva pelo auxílio na realização dos testes-ELISA, por ceder anticorpos para realização das reações de imunocitoquímica e por ajudar nas análises estatísticas e confecção dos gráficos;
- Ao Pr^o Dr Marcelo Emílio Beletti pelo seu importante auxílio na mensuração da carga parasitária;
- Ao Pr^o Dr Marcos Silva, por aceitar prontamente o convite para participação da banca examinadora;
- À Pr^a Dr^a Gabriela Lícia Santos Ferreira, que só pela amizade já deveria ter seu nome nessa página, mas além disso por suas sugestões tão valiosas nas análises dos resultados, pelos seus conselhos e claro pelos muitos momentos de descontração que vivemos no decorrer desse tempo;
- À minha amiga Mariana Bodini Angeloni, por me dar a oportunidade de crescermos juntas durante esses anos;
- À secretária do laboratório de Histologia, Juscélia Marques Alemar, aos técnicos: Héglio Heinisch Werneck, Rui Silva, Thiago Moraes Barbosa e Richard Átila de Sousa, por todas as vezes que desprenderam tempo e paciência para me auxiliar no que fosse necessário. Sem a ajuda de vocês com certeza as coisas seriam muito mais difíceis;
- À Isabel Marques Rodrigues Amaral (Isa) e Wellington Silva Gomes (Azul), amigos imprescindíveis para mim, obrigada por suportarem meus momentos mais complicados e por estarem presentes naqueles mais felizes, tenho certeza que vocês são amigos verdadeiros;
- À Idessania Nazareth da Costa, Bellisa de Freitas Barbosa e Angélica Gomes Oliveira, pelo companheirismo e auxílio em tudo que lhes foi solicitado sempre.

RESUMO

Parasito intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii* é um patógeno oportunista. São consideradas situações de risco, infecções congênitas e em pacientes imunossuprimidos. Poucos estudos com tratamento da toxoplasmose congênita foram realizados em modelos experimentais. Objetivou-se com esse trabalho verificar o mecanismo de transmissão materno-fetal da toxoplasmose em *Calomys callosus* tratados com associação de fármacos: sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (SPA). Fêmeas com 14 dias de gestação e inóculo de *T. gondii*, foram tratadas com SPA até o 20º dia, sendo sacrificadas a partir do 17º dia de gestação-inóculo. Tecidos fetais foram processados para análise morfológica, imunocitoquímica e bioensaio. A carga parasitária nos tecidos fetais cujas mães não receberam tratamento foi significativamente maior quando comparada com animais tratados com SPA. Camundongos inoculados com tecidos provenientes de fêmeas tratadas apresentaram soroconversão tardia. Portanto, os fármacos mostraram-se eficazes ao diminuir a carga parasitária demonstrando que a transmissão vertical da toxoplasmose pode ser alterada em decorrência do tratamento, sugerindo que *C. callosus* é um bom modelo experimental para estudos relacionados à eficiência e farmacocinética de medicamentos utilizados no tratamento de infecção congênita por *T. gondii*.

Palavras-chave: toxoplasmose congênita, tratamento, eficiência.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Interações parasito-hospedeiro	01
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	02
1.2.1. Formas infectantes	03
1.2.2. Ciclo Biológico	05
1.2.3. Cepas de <i>T. gondii</i>	07
1.3. Toxoplasmose	07
1.3.1. Grupos de risco	08
1.3.2. Tratamento	11
a. Uso de medicamentos em período gestacional	17
b. Tratamento de infecção toxoplásmica congênita	17
1.4. Modelo experimental utilizando <i>Calomys callosus</i>	18
1.5. Justificativa	19
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Grupos experimentais	21
3.2. Manutenção da cepa Me49 de <i>T. gondii</i>	21
3.3. Acasalamento, detecção de prenhez e infecção por <i>T. gondii</i>	22
3.4. Tratamento com sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (SPA)	22
3.5. Sacrifício e coleta do material	23
3.6. Processamento do material para análise morfológica	24
3.7. Processamento do material para análise imunocitoquímica	24
3.8. Bioensaio	25
3.9. Determinação de carga parasitária	25
3.10. Teste imunoenzimático: ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	26
3.11. Análises estatísticas	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Análises morfológicas	28

4.2. Análises imunocitoquímicas	28
4.3. Análises sorológicas	35
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interações parasito-hospedeiro

Os mamíferos desenvolveram mecanismos muito eficientes contra os parasitos invasores, e alguns desses por sua vez, desenvolveram táticas para escapar das respostas de defesa do hospedeiro. Uma manobra utilizada pelos parasitos consiste em refugiar-se no interior das células do hospedeiro, onde os anticorpos têm dificuldades em alcançá-los. Os protozoários recorrem, em sua maioria, a essa manobra e alguns deles (como do gênero *Plasmodium*) se estabelecem no interior dos eritrócitos, enquanto outros (como do gênero *Leishmania*) infectam exclusivamente os macrófagos e outros ainda (como do gênero *Trypanosoma*) invadem diversos tipos celulares. Por sua vez, os hospedeiros desenvolveram estratégias para lidar com esses parasitos intracelulares, desencadeando respostas imunes celulares que envolvem primariamente as citocinas do perfil Th-1, como a Interleucina-2 (IL-2), o Fator de Necrose Tumoral- β (TNF- β) e o Interferon- γ (IFN- γ) que ativam os macrófagos e as células T CD8⁺ citotóxicas que colaboram com os macrófagos através da produção de citocinas de ativação dessas células (RANG et al., 2003).

As respostas da via Th-1 podem ser *downregulated* (“infrarreguladas”) por citocinas da via Th-2, como TGF- β , IL-4 e IL-10. Alguns parasitos intracelulares estabeleceram mecanismos para manipular o equilíbrio Th-1/Th-2 a seu favor ao estimularem a produção de citocinas Th-2 que “infrarregulam” as reações imunes celulares. Assim, por exemplo, a invasão de macrófagos por espécies de *Leishmania* está associada à indução do TGF- β ; enquanto a invasão das células T, das células B e dos macrófagos por tripanosomas está associada à indução de IL-10. São observados mecanismos semelhantes nas infestações por helmintos (RANG et al., 2003).

O protozoário *Toxoplasma gondii* desenvolveu uma tática diferente - a “suprarregulação” (*upregulation*) de algumas respostas do hospedeiro. *T. gondii* infecta numerosos tipos celulares e apresenta estágio de replicação extremamente virulento; por conseguinte, é importante para o parasito que sua capacidade proliferativa seja regulada de modo a assegurar a sobrevivência de seu hospedeiro. Para isso, o parasito estimula a produção de IFN- γ , modulando, assim, as respostas do hospedeiro mediadas por células, que então promovem seu encistamento nos tecidos, onde, de acordo com as condições imunológicas do hospedeiro, conseguem sobreviver por muito tempo (KAWAZOE, 2002).

A melhor compreensão das relações entre hospedeiros e protozoários abriu novas perspectivas para o desenvolvimento de fármacos antiprotozoários. Já está sendo investigada a possibilidade de se utilizar análogos e/ou antagonistas das citocinas para o tratamento de doenças causadas por protozoários (ODEH, 2001).

1.2. *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909)

Toxoplasma gondii foi primeiramente encontrado em dois países diferentes no ano de 1908. Por Nicolle e Manceaux na Tunísia (África), em um roedor, *Ctenodactylus gundi* e, em São Paulo (Brasil), por Splendore em coelhos de laboratório (KAWAZOE, 2002; REY, 2001).

Em 1909, Nicolle e Manceaux, descreveram o parasito e criaram o gênero *Toxoplasma* e a espécie *Toxoplasma gondii*. Porém, somente na década de 60 *T. gondii* passou a ser objeto de pesquisa, em decorrência do conhecimento de sua ampla distribuição geográfica e de sua capacidade de infectar várias espécies de aves e mamíferos (inclusive o homem). Dessa forma, características como: morfologia, formas infectantes, hospedeiros, ciclo biológico, epidemiologia, métodos diagnósticos e terapêuticos para a toxoplasmose, puderam ser mais bem formuladas (KAWAZOE, 2002).

Segundo Rey (2001), a classificação taxonômica do parasito é a seguinte:

Reino: Protista; **Sub-reino:** Protozoa; **Filo:** Apicomplexa; **Classe:** Sporozoa; **Sub-classe:** Coccidia; **Ordem:** Eucoccidia; **Sub-ordem:** Eimeriina; **Família:** Sarcocystidae; **Gênero:** *Toxoplasma*; **Espécie:** *Toxoplasma gondii*.

T. gondii apresenta uma grande distribuição geográfica e demonstra ser bastante resistente às condições ambientais diversas. Invade os mais diferentes tipos celulares em mamíferos e aves. Possui maior afinidade por células do sistema fagocítico mononuclear e para leucócitos (REY, 2001; McLEOD et al., 1991).

A morfologia de *T. gondii* é dependente do estágio de desenvolvimento do parasito que se analisa. De maneira geral, o protozoário apresenta forma arqueada, possui núcleo primariamente central ou mais deslocado para a região posterior do corpo e também a maioria das estruturas constitutivas de uma célula eucariota, tais como: mitocôndria, complexo de Golgi e lisossomos (BLACK, BOOTHROYD, 2000; REY, 2001).

Por meio de microscopia eletrônica, pode-se notar a presença de uma membrana externa simples (unitária) e uma membrana interna dupla (formada pela união de duas

membranas unitárias), essa última é constituída por frestas, sobretudo no pólo anterior do parasito, no qual se localiza o complexo apical (REY, 2001).

O complexo apical é característico do filo Apicomplexa, e é formado por algumas organelas específicas: conóide, anel polar (em número de dois), microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos (KAWAZOE, 2002). Essas organelas, segundo Bonhomme et al. (1992), têm funções secretoras, liberando enzimas proteolíticas que auxiliam na invasão da célula hospedeira, bem como na formação do vacúolo parasitóforo.

No contato inicial entre parasito e célula hospedeira, as micronemas descarregam seu conteúdo protéico. Feito isso, algumas proteínas ainda permanecem aderidas à superfície do complexo apical para que a ligação com os receptores de membrana da célula hospedeira aconteça (CARRUTHERS, 2002).

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório e, parece não contar com participação da célula hospedeira no processo de invasão celular, como acontece com bactérias e fungos, por exemplo. A penetração de *T. gondii* é ativa e dependente de actina, miosina e do conteúdo protéico liberado pelas roptrias e micronemas (CARRUTHERS, 2002).

O processo de invasão é aparentemente rápido (15 a 20 segundos) e é composto das seguintes fases: reconhecimento, adesão, penetração e mecanismos de defesa. Reconhecimento e adesão são dependentes de receptores, em ambas as células, para laminina e fibronectina e também de moléculas adesivas oriundas das micronemas. As enzimas proteolíticas liberadas pelas roptrias e micronemas auxiliam na penetração, além disso, há participação de movimentos do complexo apical como: rotação, extrusão e retração. Após a penetração e a formação do vacúolo parasitóforo, glicoproteínas provenientes dos grânulos densos, auxiliam na defesa e manutenção do parasito no interior da célula hospedeira, impedindo a ligação entre lisossomos e vacúolo (CARRUTHERS, 2002; FERRO, 2000).

1.2.1. Formas Infectantes

Há três formas evolutivas e infecciosas de *T. gondii*: taquizoítas, bradizoítas (em cistos teciduais) e esporozoítas (em oocistos) (KAWAZOE, 2002).

Os taquizoítas são a forma de proliferação rápida encontrada em tecidos biológicos, ocasionando a formação de vacúolos parasitóforos, ou pseudocistos (MONTROYA, LIESENFELD, 2004). Esse termo foi primeiramente utilizado por Frenkel (1973), pois “takys” tem origem grega e significa rápido, lembrando o acelerado processo de reprodução

dessa forma, a endodiogenia, que é um tipo complexo de reprodução assexuada, no qual uma célula-mãe, após sofrer várias divisões é capaz de formar duas células-filhas em seu interior (REY, 2001).

Com dimensões aproximadas de 5 a 6µm de comprimento por 2 a 3 µm de largura, este estágio de desenvolvimento do parasito apresenta organelas típicas de células eucariontes, como: mitocôndrias, complexo de Golgi, ribossomos, retículo endoplasmático entre outras. São ricos em lipídeos e podem apresentar, em pequenas quantidades, grânulos densos e de amilopectina (FERRO, 2000; REMINGTON et al., 2001).

Ao penetrarem nas células hospedeiras, alguns taquizoítas passam a apresentar um metabolismo mais lento e por consequência se proliferam mais lentamente, diferenciando-se em bradizoítas, que se mantêm no interior de cistos teciduais. Os cistos teciduais medem de 20 a 30µm de diâmetro, contendo até 3000 bradizoítas em seu interior e apresentam uma membrana originada diretamente da membrana do vacúolo parasitóforo (GROSS et al., 1996).

Estágio predominante da fase crônica da infecção, os bradizoítas são encontrados no interior de cistos em diferentes tecidos, como por exemplo, musculatura esquelética, miocárdio e sistema nervoso (KAWAZOE, 2002). Esse termo também foi designado por Frenkel (1973), e representa a forma lenta de multiplicação desse organismo no interior da célula hospedeira (“bradys” = lento), que se dá igualmente pelo processo de endodiogenia (FERRO, 2000; REY, 2001).

Morfologicamente os bradizoítas são semelhantes aos taquizoítas, porém com núcleo deslocado em direção à região posterior do protozoário e com alta quantidade de grânulos de amilopectina. São ainda mais resistentes a enzimas proteolíticas (FERRO, 2000; JACOBS et al., 1960).

Os esporozoítas estão contidos no interior de oocistos e são liberados juntamente com as fezes de felinos infectados por *T. gondii*. É um estágio de resistência do parasito, apto a contaminar água, solo e alimentos (AMENDOEIRA, 1995).

Os oocistos não esporulados normalmente são ovais e quando maduros, são elípticos e medem de 11 a 14µm de diâmetro. Esses últimos, no ambiente, podem se manter infectivos por meses ou até anos, sendo altamente resistentes a esterilizantes químicos e desinfetantes, e também à variações de umidade e temperatura (-20 até 37,5°C) (McLEOD et al., 1991; REMINGTON et al., 2001; MONTROYA, LIESENFELD, 2004).

São estruturalmente semelhantes às outras formas infectantes, diferenciando-se apenas por apresentarem um maior número de micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina (FERRO, 2000).

1.2.2. Ciclo Biológico

Os parasitos do filo Apicomplexa possuem um ciclo de vida típico e complexo, sendo que cada estágio do mesmo ocorre no interior de células específicas para um único hospedeiro. No entanto, *T. gondii* não segue esse padrão, apesar de seu estágio sexuado ser restrito a células de felinos, o estágio assexuado está apto a invadir e se desenvolver em vários tipos celulares de diferentes espécies, como: humanos, animais domésticos, pássaros, marsupiais entre outras (SMITH, 1995).

Felinos do gênero *Felix* e *Lynx* são hospedeiros definitivos de *T. gondii* e se contaminam ao ingerirem cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítas, dando início à fase enteroepitelial do ciclo, que se processa nas células epiteliais do intestino delgado desses animais (KAWAZOE, 2002; REY, 2001; DUBEY et al., 1998).

O ciclo induzido por bradizoítas é mais conhecido. A parede dos cistos teciduais ingeridos por gatos é rompida nos estômagos dos mesmos, por ação de enzimas proteolíticas, assim, vários bradizoítas são liberados (DUBEY et al., 1998). Ao chegar no intestino delgado, o bradizoíta penetra na célula epitelial, onde se inicia a fase assexuada do ciclo, também denominada merogamia, com a formação inicial de um trofozoíto, a divisão nuclear, a formação dos merozoítos e sua liberação na luz intestinal. Os merozoítos liberados penetram em novas células epiteliais e iniciam a fase sexuada do processo, denominada gamogamia, que é dividida em duas etapas: i) o merozoíto diferenciado em macrogametócito jovem tem o desenvolvimento de seu citoplasma até sua maturação em macrogameta (gameta feminino) e ii) o outro merozoíto se diferencia em microgametócito jovem, que inicia a divisão nuclear e após amadurecimento, dá origem ao microgameta flagelado (gameta masculino). A fusão de um microgameta com um macrogameta dá origem ao zigoto, que após elaboração da membrana cística diferencia-se em oocisto imaturo. Esse oocisto é liberado na luz intestinal, sendo eliminado juntamente com as fezes. No solo, o oocisto se torna maduro após um processo de esporogonia, originando os esporozoítas, tornando-se infectante aos hospedeiros susceptíveis (DUBEY et al., 1998; DUBEY, BEATTIE, 1988; REY, 2001; KAWAZOE, 2002; JACKSON, HUTCHISON, 1989).

Nos felinos, o período pré-patente (tempo gasto para liberação de oocistos após a primo-infecção) e a frequência da liberação de oocistos, variam de acordo com o estágio de *T. gondii* ingerido. Após a ingestão de cistos teciduais, o período pré-patente é de 3 a 10 dias e de 18 dias ou mais após a ingestão de oocistos (DUBEY, 2005). O período pré-patente após a

ingestão de estágios transicionais entre taquizoítas e bradizoítas pode variar de 11 a 17 dias (DUBEY, 2002; 2005).

Hospedeiros intermediários (mamíferos e aves) se contaminam com *T. gondii* através da ingestão de oocistos maduros no solo; ingestão de cistos teciduais contidos em carnes cruas ou mal cozidas; ingestão de taquizoítas em líquidos orgânicos como: leite, saliva e esperma; infecção congênita; órgãos transplantados e; acidentes laboratoriais (FERRO, 2000). Uma vez ingeridos por esses hospedeiros intermediários, os oocistos sofrem degradação, liberando esporozoítas, forma que participará, em primeira etapa, do processo de invasão das células hospedeiras. Imediatamente após essa etapa, esporozoítas passam a sintetizar e expressar proteínas específicas de taquizoítas, formas que passarão a sofrer reprodução assexuada por endodiogenia (SPEER et al., 1995). Em menos de dois dias, inúmeros taquizoítas estarão prontos para serem liberados e invadirem novas células. Essa etapa do ciclo caracteriza a fase aguda da infecção. A fase crônica tem início com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, quando grande parte dos parasitos torna-se encistada no interior das células, diferenciando-se em bradizoítas (DUBEY, BEATTIE, 1988).

Dubey (2001) demonstrou que oocistos são menos infectivos e patogênicos para gatos do que para outros hospedeiros, como porcos, por exemplo. Em contrapartida, bradizoítas são menos infectivos para camundongos em relação aos felinos.

O esquema do ciclo biológico que segue mostra, resumidamente, as inter-relações entre as diferentes formas evolutivas do parasito e alguns de seus hospedeiros:

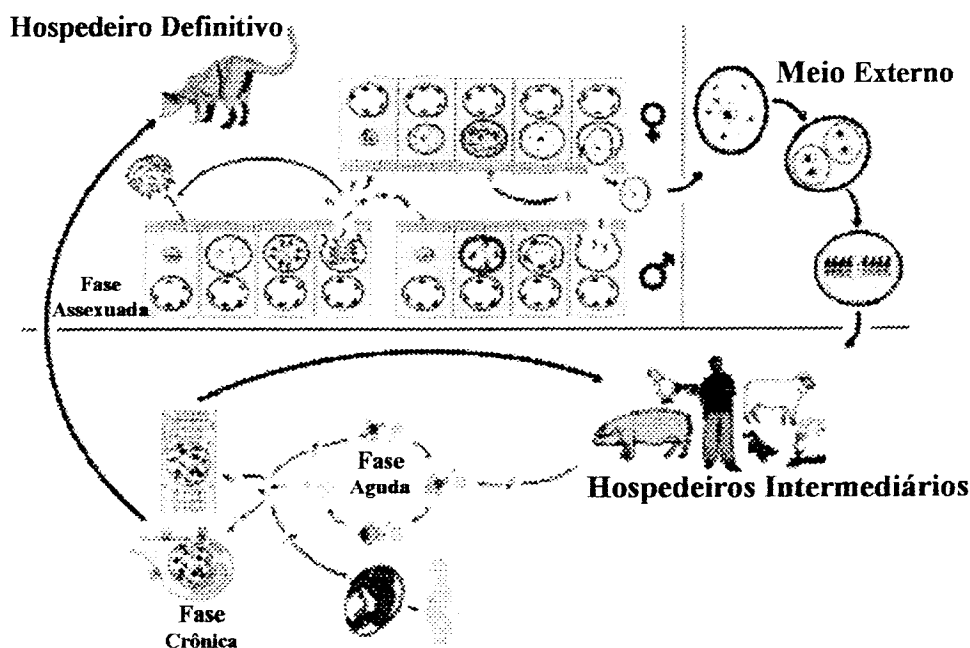


Figura 01. Ciclo Biológico do protozoário *Toxoplasma gondii*. Segundo Ferguson, 2004.

1.2.3. Cepas de *T. gondii*

Manifestações clínicas e severidade da infecção estão diretamente relacionadas à interação entre parasito e hospedeiro, que incluem: virulência da cepa; via e quantidade do inóculo; competência do sistema imune, integridade da mucosa e barreira epitelial, idade e genótipo do hospedeiro (RORMAN et al., 2005).

T. gondii possui três linhagens genéticas diferentes, designadas Tipos I, II e III (HOWE, SIBLEY, 1995). A virulência das cepas está basicamente relacionada à rapidez com que matam roedores, nesse sentido, cepas do tipo I (por exemplo, RH e CAST) são consideradas mais patogênicas do que as cepas tipo II (exemplo Me49) e III (exemplo VEG) (DUBEY 1998; ARAUJO, SLIFER, 2003).

A recombinação genética entre duas linhagens de cepas distintas e competentes do parasito, gera naturalmente a evolução da virulência de *T. gondii* (MONTROYA, LIESENFELD, 2004). Grigg e colaboradores (2001), em estudos recentes de análises polimórficas das diferentes linhagens de *T. gondii*, relataram que simples recombinações gênicas entre as mesmas ocorrem há mais de 10.000 anos. Estes autores demonstraram ainda, que a recombinação gênica *in vitro* entre duas cepas avirulentas de *T. gondii* pode gerar uma outra cepa altamente virulenta (GRIGG et al., 2001).

Uma das cepas de *T. gondii*, a Me49 (tipo II), foi originalmente isolada de carneiros em 1965 e é basicamente mantida em suspensões cerebrais de roedores em laboratório. É cistogênica e avirulenta ou de baixa virulência (LUNDE, JACOBS, 1983). Em camundongos BALB/c a cepa Me49 produz cistos evidentes no cérebro. Já em camundongos C57BL/6, pode desenvolver meningoencefalite com elevada taxa de mortalidade após a 12ª semana de infecção (GAZZINELLI et al., 1993). Já *Calomys callosus*, uma espécie de roedor encontrada na América do Sul, é resistente a esta cepa, permitindo, por exemplo, melhor acompanhamento da transmissão congênita desse parasito (PEREIRA et al., 1999).

1.3. Toxoplasmose

Zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, a toxoplasmose é adquirida principalmente por via oral ou transplacentária e, após aquisição inicial, tem-se parasitemia e disseminação por todo organismo do hospedeiro. Após a fase aguda, os parasitos encistam-se em muitos tecidos. Esses tecidos contêm toxoplasmas viáveis, os quais não afetam

diretamente hospedeiros imunocompetentes. Sua existência é indicada pela presença e persistência de anticorpos específicos (HALL, 1992).

A prevalência de pessoas com sorologia positiva para *T. gondii* é grande, sendo que especialistas já garantem que esse protozoário possa ser o mais difundido entre a população humana e animal (KAWAZOE, 2002).

Estima-se que 25 a 80% da população mundial esteja exposta à infecção toxoplásmica (REMINGTON et al., 2001). Acredita-se que 16 a 60% dos norte-americanos sejam infectados, e nas Américas Central e Sul e também no continente europeu, a estimativa é de 50 a 80% da população (JONES et al., 2001; DUBEY, 2004). As consideráveis diferenças entre os níveis de prevalência mundial estão relacionadas a fatores tais como: condições climáticas; população de felinos; hábitos de higiene e culturais; e situações diversas que favorecem a aquisição da infecção via solo contaminado (MONTTOYA, LIESENFELD, 2004; BOYER et al., 2005), considerando ainda o genótipo dos hospedeiros que conferem ou não maior susceptibilidade à infecção (SEGAL, HILL, 2003). Remington e colaboradores (2001) relataram que a alta prevalência para *T. gondii* em países como Itália e França, está relacionada ao hábito de consumir carne mal cozida ou crua e, nos países da América Latina pode ser atribuída às condições climáticas e à considerável população de felinos.

Quando adquirida pós-natal, por indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose é assintomática em praticamente 90% dos casos (REY, 2001). Contudo, quando há sinais clínicos nessas situações, eles podem ser: febre, linfadenopatia, mal estar, mialgias, cefaléia, anorexia, retinocoroidite, podendo causar ainda alterações na visão ou até sua perda total (MONTTOYA, LIESENFELD, 2004).

A toxoplasmose é considerada grave para humanos quando adquirida por mulheres gestantes, pois está associada à má formação congênita do conceito, e em pacientes imunossuprimidos, podendo levar ao desenvolvimento de meningoencefalite que, geralmente, pode ser considerada fatal (JEFFREY et al., 2005).

1.3.1. Grupos de risco

- **Pacientes imunodeficientes:**

A doença é extremamente grave em pacientes imunodeprimidos. Infecções assintomáticas em estágio crônico passam a ter caráter agudo em pessoas que apresentam depressão imunológica de origem diversa, ou em consequência de terapia imunodepressora (REY, 2001).

Cerca de 10 a 50% dos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), que são soropositivos para *T. gondii*, desenvolvem toxoplasmose (KAWAZOE, 2002). Normalmente, a maioria das cepas isoladas de pacientes assim é do Tipo II (MONTTOYA, LIESENFELD, 2004). Nesses casos, o local mais afetado pela infecção toxoplásmica é o Sistema Nervoso Central. Os parasitos, instalando-se em células nervosas, provocarão lesões focais múltiplas, principalmente no hemisfério cerebral (área frontoparietal) ou no gânglio basal e cerebelo. As manifestações clínicas incluem cefaléia, febre, anomalias focais provocando hemiparesia leve até a perda da capacidade de coordenação muscular, confusão e retardamento mental, convulsões, letargia, que pode progredir para estupor, coma, até a morte do paciente. Há também casos de delírios e alucinações visuais (MONTTOYA, LIESENFELD, 2004; KAWAZOE, 2002).

Outro sinal clínico, a pneumonite, é freqüentemente descrito em pacientes transplantados, porém, indivíduos HIV-positivos também podem apresentar esse tipo de manifestação (MONTTOYA & LIESENFELD, 2004).

- **Toxoplasmose congênita:**

A forma congênita da toxoplasmose se dá pela transmissão vertical de taquizoítos de *T. gondii* via placenta. Normalmente, essa transmissão ocorrerá quando uma mulher grávida, soronegativa para *T. gondii* e com condições para respostas imunes normais, for acometida por infecção toxoplásmica primária (JEFFREY et al., 2005; RORMAN et al., 2005). Logo, a transmissão congênita tanto pode se dar por infecção materna aguda ou por infecção crônica, através de reativação da doença causada por disfunção imunológica da mãe (BEAZLEY, EGERMAN, 1998; REMINGTON et al., 2001).

Muitos fatores estão associados à ocorrência da toxoplasmose congênita, incluindo: via de transmissão; condições climáticas; comportamentos culturais e higiênicos e; hábitos alimentares (RORMAN et al., 2005). Mundialmente, em cada 1000 nascimentos, cerca de 3-8 crianças entraram em contato com o parasito ainda no útero (KAWAZOE, 2002).

Avelino e colaboradores (2004) conduziram estudos recentes na cidade de Goiânia, Brasil, região com alta taxa de infecção toxoplásmica, e onde mulheres grávidas têm cerca de duas vezes mais chances de se soroconverterem em comparação à mulheres que não estejam grávidas. Entre as mulheres grávidas, as adolescentes têm apresentado maiores índices de soroconversão. Para os autores, essa alta vulnerabilidade de infecção por *T. gondii* durante a gestação, pode resultar da combinação entre a imunodepressão pela qual essas mulheres passam e também por fatores relacionados às condições hormonais (AVELINO et al., 2004).

Normalmente apenas casos de transmissão congênita da doença a partir de primoinfecção materna são relatados (CHEMLA et al., 2002). Um interessante caso reportado recentemente abordou a transmissão vertical da doença a partir de uma mulher com sinais clínicos de toxoplasmose ocular infectada 20 anos antes de ficar grávida. A mãe apresentava uma “cicatriz toxoplásmica” na retina e era positiva para testes de anticorpos IgG específicos para *T. gondii*. O recém-nascido apresentou positividade para ambos anticorpos IgG e IgM, *T. gondii* específicos, e além disso foi verificada uma cicatriz macular na retina, sinal típico de toxoplasmose, e aparente calcificação cerebral (SILVEIRA et al., 2003). Casos como esses podem ser atribuídos a uma re-infecção materna com diferente e mais virulenta cepa do parasito ou ainda a uma reativação da doença crônica (DOLLFUS et al., 1998).

Mulheres cronicamente infectadas, quando são imunodeficientes, também podem transmitir verticalmente a infecção. O risco de casos assim ocorrerem é de difícil quantificação, porém, é geralmente baixo. Lactentes soropositivas para *T. gondii*, podem reativar a doença em decorrência de alguma imunodepressão, o que pode resultar em transmissão do parasito via leite materno (LEBECH et al., 1996).

A taxa de transmissão durante a primoinfecção materna é de aproximadamente 25%, 54% e 65% nos 1º, 2º e 3º trimestres de gestação respectivamente (MOZZATTO, PROCIANOY, 2003).

A idade gestacional em que a transmissão do parasito ocorre e a decorrente severidade da doença são dependentes, ou seja, infecção materna no início da gestação (1º e 2º trimestres), pode resultar em toxoplasmose congênita severa, podendo levar à morte do feto no útero ou aborto espontâneo. Em contrapartida, infecção materna tardia (3º trimestre), usualmente resulta em recém-nascidos aparentemente normais (MONTROYA, LIESENFELD, 2004).

Os sinais clínicos da toxoplasmose congênita variam enormemente. Aproximadamente 2/3 dos neonatos são assintomáticos, porém, esses podem apresentar seqüelas mais tardiamente, tais como: microcefalias, hidrocefalias, coriorretinites, uveítes, surdez e atrasos no desenvolvimento psicomotor (MOZZATTO, PROCIANOY, 2003).

Hidrocefalia, calcificação intracraniana e coriorretinite formam juntas uma “clássica tríade” que serve de base para o diagnóstico da doença. No entanto, esses sinais também podem ser causados, de forma congênita, por outros patógenos intracelulares, como citomegalovírus, vírus herpes, vírus da rubéola e *Treponema pallidum* (MONTROYA, LIESENFELD, 2004). Quando se adiciona o quadro de retardamento mental aos três sinais clínicos descritos acima, compõem-se a “tétrade de Sabin”, que é um lema orientador para o

diagnóstico da toxoplasmose congênita (NETO et al., 1982). Remington e colaboradores (2001) classificam a doença em quatro formas: infecção subclínica, doença neonatal, doenças nos primeiros meses de vida e seqüelas tardias.

A prevenção da toxoplasmose congênita pode ser dividida em três categorias: primária, secundária e terciária. A prevenção primária se caracteriza basicamente por programas de educação e saúde pública, recomendando às gestantes que evitem contatos com materiais potencialmente contaminados com fezes de gatos e ingestão de carnes cruas ou mal cozidas. A prevenção secundária consiste em tentar evitar a transmissão transplacentária do parasito, através da administração de agentes quimioterápicos, para as gestantes em que se evidenciou infecção aguda. Finalmente a prevenção terciária concentra seus esforços em realizar um diagnóstico precoce, que permita a introdução do esquema terapêutico para prevenir ou minimizar os riscos de seqüelas futuras (HALL, 1992).

Os riscos da toxoplasmose congênita podem ser estabelecidos quando diagnóstico da soroconversão materna e idade gestacional na qual ocorreu, são confirmados, o que é de extrema importância na condução de terapêutica eficiente (MONTROYA, LIESENFELD, 2004). Sendo assim, Chemla e colaboradores (2002) sugerem, se possível, um monitoramento sorológico materno antes da concepção até um mês após o parto em todas as mulheres que se mantêm negativas para a toxoplasmose no decorrer do período gestacional.

Testes sorológicos, especialmente os imunoenzimáticos, são exames de rotina para o diagnóstico da doença. A detecção de anticorpos IgM, IgA, e/ou IgE *T. gondii*-específicos em sangue de cordão umbilical ou de recém-nascidos, também é utilizada para estabelecer diagnóstico da doença. Além disso, é possível detectar o parasito em fluidos corporais por isolamento em cultura de tecidos ou por inoculação em camundongos. Pode-se utilizar ainda a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do próprio DNA genômico toxoplásmico (NAESSENS et al., 1999).

O tratamento da infecção congênita para crianças iniciado na vida intra-uterina ou nos primeiros meses de vida, é capaz de reduzir a frequência e severidade de seqüelas tardias (RORMAN et al., 2005).

1.3.2. Tratamento

A terapêutica atual para a toxoplasmose não pode ser considerada totalmente eficaz, pois a maioria dos estudos realizados com os fármacos é conduzida em animais de laboratório no início da infecção, atuando contra as formas proliferativas (taquizoítas) do parasito e não

contra os cistos teciduais. Logo, o que se tem são medicamentos parcialmente eficientes no tratamento de infecções agudas e pouco ou nada eficientes na fase crônica da doença (GRUJIC et al., 2004).

Já que a maioria dos indivíduos soropositivos para *T. gondii* apresenta quadros assintomáticos e, pelo fato das drogas empregadas serem tóxicas devido ao uso prolongado e altas dosagens, apenas o tratamento em certas circunstâncias é recomendado, tais como nos pacientes apresentando toxoplasmose ocular, nos indivíduos imunocomprometidos e nos casos confirmados de transmissão congênita (KAWAZOE, 2002).

A terapêutica clássica contra a toxoplasmose é a combinação de sulfadiazina e pirimetamina. A associação com ácido folínico é comum no tratamento, uma vez que os fármacos acima citados têm capacidade de eliminar o ácido fólico tanto do parasito quanto do hospedeiro (MONTROYA, LIESENFELD, 2004).

Em gestantes primoinfectadas por *T. gondii*, a espiramicina é a droga mais indicada. Em caso de infecção fetal confirmada a associação entre sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico, é acrescentada, uma vez que a espiramicina parece ser ineficaz na transposição da barreira placentária (REMYINGTON et al., 2001).

Braz e colaboradores (1999) conduziram estudos em camundongos BALB/c inoculados com cepa RH de *T. gondii*, e demonstraram que a interação entre os fármacos azitromicina e pirimetamina pode ser uma alternativa eficiente no tratamento desta protozoose.

A clindamicina tornou-se um medicamento alternativo, porém não muito eficiente, no tratamento da toxoplasmose para indivíduos que apresentam tolerância às sulfonamidas (REY, 2001).

Seguem-se características gerais de alguns fármacos utilizados no tratamento da toxoplasmose:

Sulfonamidas:

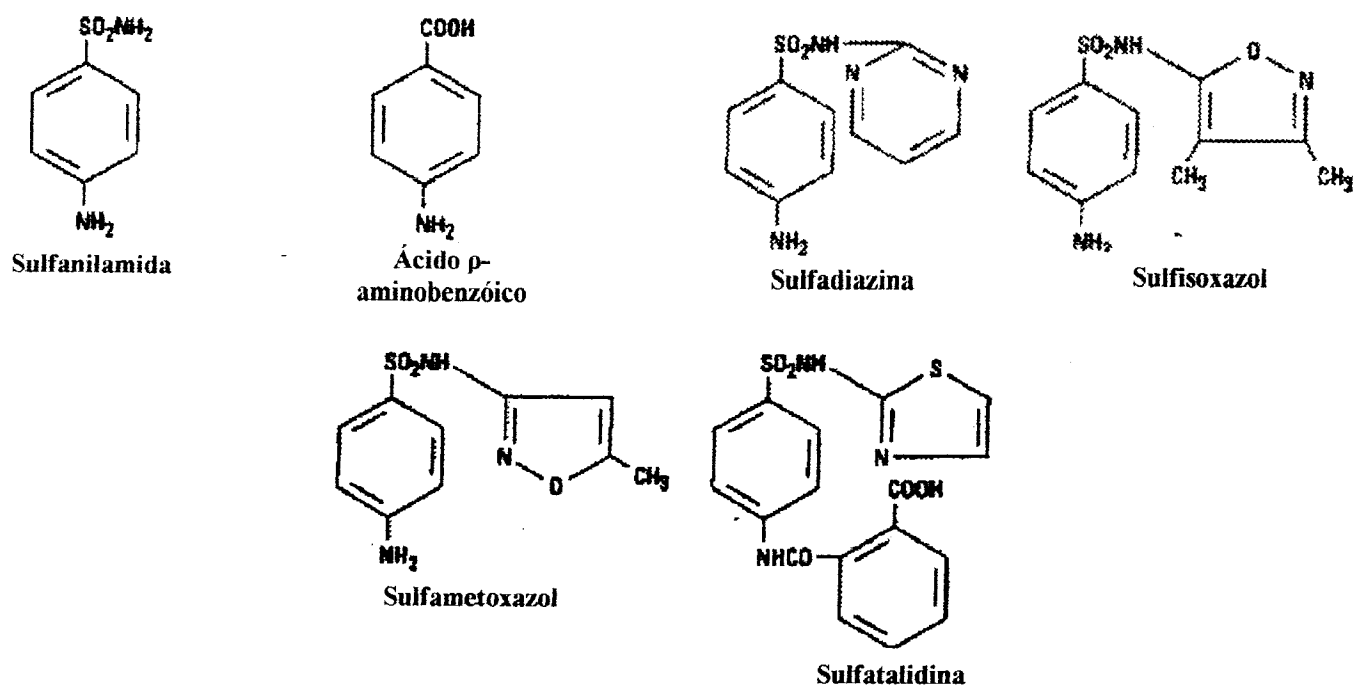


Figura 02. Estruturas químicas de algumas sulfonamidas e do ácido p-aminobenzoico. Segundo Katzung (2005).

Na década de 1950, Domagk foi o primeiro a demonstrar que um agente quimioterápico era capaz de influenciar na evolução de uma infecção bacteriana. A substância utilizada era o *prontosil*, um corante que demonstrou ser um pró-fármaco inativo *in vitro*, exigindo seu metabolismo *in vivo*, resultando no produto ativo – sulfanilamida (RANG et al., 2003).

A Fig. 02 mostra a forma básica das sulfonamidas e sua semelhança estrutural com o ácido p-aminobenzoico (PABA). A ligação de substâncias ao grupo amino (-SO₂ – NH – R) ou ao grupo amino (-NH₂) do núcleo sulfanilamida, produz sulfonamidas com propriedades físicas, químicas, farmacológicas e antimicrobianas variáveis. Normalmente, as sulfas são ácidos fracos, cristalinos, inodoros, amargos e solúveis em pH alcalino (KATZUNG, 2005).

A forma de atuação das sulfas é um bom exemplo de inibição por competição. Microorganismos sensíveis necessitam de PABA para sintetizar seu próprio ácido fólico, que em sua forma reduzida é essencial para síntese de DNA e RNA dos mesmos. As sulfonamidas

são inibidores competitivos da enzima diidropteroato-sintase (enzima responsável, em parte, pela formação do ácido fólico), atuam na reação no lugar do PABA e formam análogos não-funcionais do ácido fólico. Dessa maneira, esses tipos de microorganismos não são capazes de se multiplicar. Fármacos assim não afetam células de mamíferos, pois essas dependem de ácido fólico já existente, uma vez que são incapazes de formá-lo. Como esse é um caso de antagonismo competitivo entre as sulfas e o PABA, um aumento na concentração de algum deles desloca o outro, portanto, na administração de sulfas deve ser evitado o uso de compostos derivados do PABA (GOOLDMAN, GILMAN, 2001; KATZUNG, 2005; RANG et al., 2003; FARHAT et al., 1998).

Um dos tipos de sulfas, a sulfadiazina (Fig. 02), possui meia-vida de aproximadamente 10 a 12 horas. É administrada via oral e absorvida pelo trato gastrointestinal. Possui ampla distribuição pelos líquidos teciduais, atingindo: pleura, bile, líquido, líquido sinovial, olhos, leite materno, placenta e feto (FARHAT et al., 1998). É metabolizada no fígado e sofre reabsorção tubular (SPINOSA et al., 1999). É facilmente excretada pelos rins, tanto na forma livre quanto na acetilada, rapidamente no início e, a seguir, mais lentamente, no decorrer de um período de 2-3 dias (GOOLDMAN, GILMAN, 2001).

A utilização de sulfonamidas pode produzir efeitos colaterais típicos de quimioterápicos antifolato, tais como anemia megaloblástica, leucopenia e granulocitopenia. Outros efeitos adversos incluem febre, erupções cutâneas, dermatite esfoliativa, náusea, vômitos, diarreia e dificuldades atribuíveis ao trato urinário (KATZUNG, 2005).

No tratamento da toxoplasmose, para adultos e crianças, a dosagem de sulfadiazina recomendada é de 75 a 100 mg/Kg de peso do paciente por dia, dividida em quatro doses, via oral. Este esquema terapêutico deve se estender por 2 a 4 semanas. Caso apareçam fenômenos tóxicos, deve ser encurtada a duração deste tratamento. No entanto, se a doença ativa persistir, deve ser prolongado este esquema terapêutico (REY, 2001).

As sulfas são raramente utilizadas como fármacos isolados. Antigamente, elas eram drogas de escolha para infecções como a pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*, na toxoplasmose, na nocardiose e, algumas vezes, em outras infecções bacterianas. Porém, hoje foram suplantadas pelo uso da associação de uma benzilpirimidina com uma sulfonamida (KATZUNG, 2005).

A sulfadiazina atinge concentrações terapêuticas no líquido cefalorraquidiano e, em associação à pirimetamina (uma variedade das benzilpirimidinas), constituem a terapêutica mais utilizada para toxoplasmose (KATZUNG, 2005).

Pirimetamina:

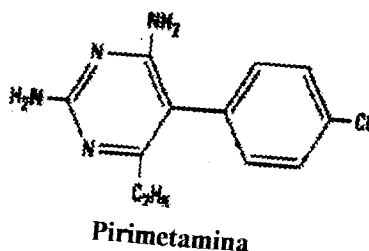


Figura 03. Estrutura química da pirimetamina. De acordo com Katzung (2005).

A enzima diidrofolato-redutase (DHFR) é um alvo clássico na quimioterapia antiparasitária, bastante utilizada no combate contra espécies de *Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Eimeria*. A pirimetamina (Fig. 03) é um protótipo inibidor da DHFR, inibindo-a mais ativamente em protozoários do que em células de mamíferos (RANG et al., 2003; GOOLDMAN, GILMAN, 2001).

As enzimas DHFRs convertem o ácido diidrofolico em ácido tetraidrofólico, um processo que leva à síntese de purinas e, por fim, de DNA. A pirimetamina quando administrada juntamente com as sulfonamidas, produz bloqueio sequencial dessa etapa metabólica, resultando em aumento acentuado (sinergismo) da atividade de ambos os fármacos (Fig. 04) (KATZUNG, 2005).

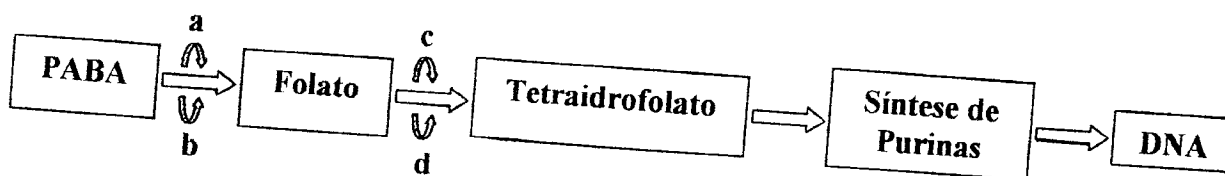


Figura 04. Ação das sulfonamidas e da pirimetamina sobre a síntese de folato em microorganismos. (a) e (c) são respectivamente as enzimas: Diidropteroato-sintetase e Diidrofolato-sintetase; e (b) e (d) são respectivamente os fármacos: Sulfonamida e Pirimetamina. Segundo Katzung, 2005.

Após administração oral, a pirimetamina é lenta, porém totalmente absorvida, alcançando níveis plasmáticos máximos em cerca de 4-6 horas. O composto se liga às proteínas plasmáticas e se acumula principalmente nos rins, pulmões, fígado e baço. É eliminado lentamente com meia-vida de cerca de 80-95 horas. Diversos metabólitos da droga são encontrados na urina e leite materno (GOOLDMAN, GILMAN, 2001).

A pirimetamina produz efeitos adversos previsíveis de um fármaco antifolato, em particular a supressão da atividade da medula óssea, podendo ocasionar anemia megaloblástica, leucopenia e granulocitopenia (FARHAT et al., 1998; KATZUNG, 2005). Efeitos colaterais também possíveis, porém menos frequentes são: náusea, vômitos e erupções cutâneas (RANG et al., 2003). Doses mais altas de pirimetamina associadas à sulfadiazina, utilizadas no tratamento da toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos, podem produzir erupções cutâneas, mielossupressão e nefrotoxicidade em cerca de 40% dos casos (GOOLDMAN, GILMAN, 2001).

Para adultos, a dose de pirimetamina recomendada para o tratamento da toxoplasmose é de 75 a 100 mg/dia, no decorrer de 10 dias, quando é reduzida para 50 mg/dia, durante mais 10 dias e, depois, 25 mg/dia enquanto persistirem os sintomas. Para crianças, recomenda-se 2 mg/Kg/dia divididos em duas doses, nos três primeiros dias; a partir do 4º dia de tratamento, recomenda-se reduzir a dose à metade, se as manifestações clínicas permanecerem, ou à quarta parte quando não houver mais sintomatologia (REY, 2001).

Parasitas dos filos Apicomplexa e Kinetoplastida têm desenvolvido resistência à ação de fármacos antifolato, em decorrência de mutações puntiformes isoladas em seus genes, que podem resultar em diminuição da permeabilidade celular, produção excessiva da diidrofolato-redutase (DHFR) ou produção de uma redutase alterada com conseqüente redução da ligação à droga (RANG et al., 2003; KATZUNG, 2005).

Na tentativa de minimizar os efeitos indesejáveis decorrentes da supressão da medula óssea causada por esse tipo de droga, durante o tratamento de infecções parasitárias, faz-se necessário o uso concomitante de ácido fólico (REMINGTON et al., 2001; RANG et al., 2003; KATZUNG, 2005; GOOLDMAN, GILMAN, 2001; REY, 2001; FARHAT et al., 1998).

Ácido Fólico:

Os folatos são necessários para reações bioquímicas essenciais que fornecem os precursores para a síntese de aminoácidos, purinas e DNA. As conseqüências de deficiência de folato ultrapassam o problema da anemia, haja vista que está implicada como causa de más formações congênitas em recém-nascidos e pode desempenhar papel em doenças vasculares (KATZUNG, 2005).

O ácido fólico é um produto da redução do ácido fólico e atua como acceptor de várias unidades monocarbônicas (GOOLDMAN, GILMAN, 2001). Se, na tentativa de

amenizar os efeitos tóxicos das drogas antifolato, administradas à pacientes em tratamento de infecções parasitárias, fosse utilizado o ácido fólico e não o folínico, aquele anularia a ação dos fármacos sobre os parasitos (REY, 2001).

Dessa forma, Rey (2001) sugere que, durante o tratamento de infecções toxoplásmicas agudas, com a combinação dos fármacos sulfadiazina/pirimetamina seja utilizado concomitantemente ácido folínico na dosagem de 2 a 20 mg/dia.

a. Uso de medicamentos em período gestacional:

A maioria dos fármacos administrados às mulheres grávidas têm a capacidade de transpor a placenta e expor o embrião (ou feto) em desenvolvimento à seus efeitos farmacológicos e teratogênicos. A utilização de fármacos nesse período pode se dar ou por necessidade de tratamento materno (mães que adquirem infecções agudas nesse período, por exemplo) ou por necessidade de se fazer uma terapia fetal (impedir ou amenizar a transmissão vertical de algum patógeno, por exemplo) (BRIGGS et al., 2002).

Os fatores críticos que afetam a transferência placentária das drogas e seus efeitos sobre o feto incluem: (1) as propriedades físico-químicas da droga; (2) a velocidade com que o fármaco atravessa a barreira placentária e a quantidade que alcança o feto; (3) a duração de exposição ao fármaco; (4) as características de distribuição da droga em diferentes tecidos fetais; (5) o estágio de desenvolvimento placentário e fetal por ocasião da exposição ao medicamento; (6) os efeitos de fármacos utilizados em associação (KOREN et al., 1998).

b. Tratamento de infecções toxoplásmicas congênicas:

Quando se descobre infecção materna aguda, principalmente no início da gestação, o tratamento deve ser iniciado o mais rapidamente, para evitar uma possível contaminação fetal. Prevenção para não infecção do feto e tratamento profilático para a mãe, dependem do tempo de infecção materna e da transmissão para o neonato (REMINGTON et al., 2001).

A eficiência do tratamento anti-*T. gondii*, em infecções congênicas é baseada em dois critérios: taxa de transmissão vertical e, prevalência e severidade de seqüelas (RORMAN et al., 2005).

Nesse sentido, Remington e colaboradores (2001) sugerem intervenção quimioterápica com certos fármacos em situações específicas, como descrito a seguir:

- Mulheres grávidas com diagnóstico de infecção aguda:

Nesses casos, o fármaco mais recomendado é a *Espiramicina* (Rovamicina[®]), em dose de 1g a cada 8 horas. O tratamento deve persistir nas 21 primeiras semanas de gestação, ou continuar por toda ela se não houver diagnóstico de infecção fetal. Caso haja documentação de infecção fetal, é necessária introdução do uso da combinação: *Sulfadiazina* + *Pirimetamina* + *Ácido Folinico* (segundo dosagens especificadas abaixo), alternando a cada mês o uso ou não de espiramicina juntamente com a combinação (REMYINGTON et al., 2001).

- Casos em que há infecção fetal confirmada após 18 semanas de gestação:

Aqui é recomendada terapia feita com associação de três medicamentos: *Sulfadiazina* + *Pirimetamina* (Daraprim[®]) + *Ácido Folinico*. As dosagens recomendadas são:

- *Sulfadiazina*: 75 mg/Kg/dia, divididas em duas doses diárias, que somadas não podem ultrapassar 4g, durante dois dias. No 3º dia de tratamento, a dose passa a ser de 100 mg/Kg/dia, também divididas em duas doses diárias, não ultrapassando 4g de sulfadiazina por dia (REMYINGTON et al., 2001).

- *Pirimetamina*: 100 mg/dia, divididas em duas doses diárias por dois dias. Após esse período, a dose recomendada é de 50 mg/dia (REMYINGTON et al., 2001).

- *Ácido Folinico*: 10 a 20 mg diariamente, sendo que a utilização desse fármaco ainda deve ser continuada após uma semana de término do uso da pirimetamina (REMYINGTON et al., 2001).

O tratamento deve ser contínuo durante todo período gestacional até o parto e, se necessário, prosseguí-lo nos primeiros meses de vida do recém-nascido (ver dosagens no item 1.3.2. Tratamento) (REMYINGTON et al., 2001).

1.4. Modelo experimental utilizando *Calomys callosus*

Calomys callosus é um roedor, da família Cricetidae, de ampla distribuição no território brasileiro. São comumente encontrados em regiões rurais e apresentam grande importância do ponto de vista da saúde pública, pois são reservatórios naturais de *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO, 1973) e transmissores da febre hemorrágica argentina (JOHNSON et al., 1965; JUSTINES & JOHNSON, 1969), além de se manterem bastantes susceptíveis a doenças infecciosas e parasitárias, tais como: esquistossomose, leishmaniose (MELLO, 1977) e toxoplasmose (FAVORETO-Jr. et al., 1998; FERRO et al., 2002).

Outros roedores como ratos e camundongos têm sido bastante utilizados em estudos de toxoplasmose. Porém, ratos não são capazes de induzir casos de infecção congênita. Já em camundongos há indução tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção, diferentemente do que ocorre em humanos, em que a transmissão vertical ocorre apenas na fase aguda da infecção (FERRO et al., 2002).

C. callosus, infectados com cepa Me49 de *T. gondii*, transmitem verticalmente o parasito na fase aguda da infecção, por volta do 14º dia de gestação e infecção, o que o torna um excelente modelo experimental para a doença congênita, uma vez que simula o observado na espécie humana (FERRO et al., 2002).

Barbosa (2004) verificou que em *C. callosus*, o período de aquisição de resistência à transmissão de *T. gondii*, é de aproximadamente 60 dias, e Favoreto-Jr e colaboradores (1998) demonstraram que a infecção toxoplásmica, nesses roedores, pode contaminar vários tipos de células e órgãos, sendo o fígado o órgão mais afetado, seguido pelo baço, pulmão, encéfalo, intestino e rins.

Dessa forma, é importante investigar se *C. callosus* pode ser considerado um bom modelo experimental para estudos relacionados à eficiência e farmacocinética de medicamentos utilizados no tratamento da toxoplasmose congênita.

1.4. Justificativa

Em nosso meio, a toxoplasmose congênita é importante devido à incidência observada, às dificuldades diagnósticas no período neonatal precoce, às graves repercussões na criança afetada, à precariedade da atenção pré-natal na maioria dos serviços de saúde pública e principalmente à terapêutica ainda bastante controversa.

Nesse sentido, é necessário conhecer mais sobre a natureza dos fármacos utilizados no tratamento da toxoplasmose congênita, para melhor determinar a eficiência dos mesmos no que diz respeito à infecção fetal.

2. OBJETIVOS

- **Objetivo Geral:**

Objetiva-se com esse trabalho verificar se o mecanismo de transmissão materno-fetal da toxoplasmose em *C. callosus* pode ser alterado, minimizando a carga parasitária na prole desses animais, através da administração de medicamentos atualmente utilizados para o tratamento da toxoplasmose congênita.

- **Objetivos Específicos:**

- Analisar tecidos fetais de *C. callosus* apenas infectados com *T. gondii*, quanto às características morfológicas e carga parasitária;
- Observar aspectos morfológicos e carga parasitária de tecidos fetais de *C. callosus* infectados com *T. gondii* e posteriormente tratados com associação de fármacos constituída por sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico;
- Verificar a frequência de alterações morfológicas em embriões de *C. callosus* apenas tratados com a associação de fármacos: sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico;
- Constatar se animais infectados (mães e embriões) apresentam soropositividade para anticorpos anti-*T. gondii* em teste-ELISA;
- Analisar a soroconversão de camundongos inoculados com macerados de encéfalo e fígado de embriões de *C. callosus*, provenientes de mães infectadas com *T. gondii* e submetidas ou não ao tratamento com a associação de fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Grupos experimentais

Foram utilizadas 28 fêmeas de *C. callosus* (linhagem Canabrava), com cerca de três meses de idade, com sorologia negativa para *T. gondii*, provenientes do Biotério do setor de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram mantidas com dieta *ad libitum*, água filtrada e ração granulada, complementada com sementes de girassol, milho e aveia. Os animais permaneceram em ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com temperatura média de 25°C.

As fêmeas foram divididas em 3 grupos, denominados: grupo tratamento, grupo controle 1 e grupo controle 2.

<i>Grupo</i>	<i>Protocolo</i>
Tratamento	Fêmeas prenhes infectadas com <i>T. gondii</i> e tratadas com SPA [*]
Controle 1	Fêmeas prenhes infectadas com <i>T. gondii</i> e não-tratadas
Controle 2	Fêmeas prenhes não-infectadas e tratadas SPA [*]
* Associação de fármacos: Sulfadiazina (S); Pirimetamina (P); Ácido Folínico (A).	

3.2. Manutenção da cepa Me49 de *T. gondii*

A cepa foi mantida em encéfalos de *C. callosus* machos, através de inóculo de 20 cistos de *T. gondii*, em 0,5ml de solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS), pH 7,2, estéril, via oral, com auxílio de sonda intragástrica.

A partir do período de 30 a 45 dias pós-inóculo, estes animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, tiveram seus crânios abertos, encéfalos coletados e macerados com auxílio de pistilo, banhados com 1ml de PBS estéril e homogeneizados por aspiração em seringa de 5ml e agulha de 25 x 7mm. O material foi ressuspenso em 10ml de PBS estéril e submetido à dupla centrifugação, a 500g por 10 minutos (1800 rpm), em temperatura

ambiente. Após lavagens, os cistos foram contados, por observação ao microscópio de luz em objetiva de 10x, através de adição de uma alíquota de 20µl de suspensão, colocada entre lâmina e lamínula (24 x 24mm). A concentração foi ajustada para 20 cistos por animal em 0,5ml de PBS. Alíquotas dessa amostra foram utilizadas para inóculos de machos de *C. callosus*, para manutenção de cepa ou inóculo de fêmeas de *C. callosus* para condução do experimento.

3.3. Acasalamento, detecção de prenhez e infecção por *T. gondii*

Fêmeas virgens de *C. callosus*, com cerca de três meses de idade, foram colocadas em gaiolas com machos às 18:00 horas, seguindo uma proporção de duas fêmeas para cada macho, sendo que todos apresentavam sorologia negativa para *T. gondii*. Após 14 horas, foi verificada a presença de “rolha vaginal” (aparente mistura de sêmen com secreção vaginal, coagulada na vagina). Considerou-se o primeiro dia de gestação aquele em que cuja manhã foi observada a “rolha vaginal”.

No primeiro dia de gestação, todas as fêmeas foram submetidas à sangria para realização de testes sorológicos, para confirmar a ausência de infecção por *T. gondii*. Para obtenção das amostras de sangue, as fêmeas foram anestesiadas, por inalação com 0,1ml de mistura (1:1) de cetamina (Ketalar, Bayer S.A., São Paulo) e 2% de cloridrato de 2-(2,6 xilidino)-5,6-dhidro-4H-1,3-tiazina (Rompun, Bayer S.A., São Paulo), e a sangria foi realizada pelo plexo orbital com auxílio de capilar de vidro. Após algumas horas, as amostras de sangue foram centrifugadas, o soro coletado e posteriormente armazenado a -20°C até o momento do uso.

Após obtenção das amostras de sangue, as fêmeas dos grupos: tratamento e controle 1 receberam 20 cistos da cepa Me49 de *T. gondii*, em 0,5ml de PBS estéril, via oral, com auxílio de sonda intragástrica.

3.4. Tratamento com sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (SPA)

Segundo Ferro (1999), a transmissão vertical de *T. gondii* em *C. callosus* dá-se por volta do 14º dia de gestação e inóculo. Como a utilização dessa associação de fármacos (SPA) é recomendada quando há infecção fetal confirmada, preconizou-se, nesse modelo experimental, que o tratamento das fêmeas dos grupos: tratamento e controle 2 iniciaria no

14º dia de gestação, via oral, com auxílio de sonda intragástrica, segundo dosagens abaixo relacionadas:

FÁRMACO	DOSES*	HORÁRIOS
<i>Sulfadiazina</i>	✓ 1,125 mg/dose (2x ao dia, nos 2 primeiros dias)	6:00
	✓ 1,5 mg/dose (2x ao dia, no restante do tratamento)	18:00
<i>Pirimetamina</i>	✓ 0,025 mg/dose (2x ao dia, nos 2 primeiros dias)	12:00
	✓ 0,025 mg/dose (1x ao dia, no restante do tratamento)	24:00 (nos 2 primeiros dias)
<i>Ácido Folínico</i>	✓ 0,0075 mg/dia	12:00

* As doses foram ajustadas para *C. callosus*, de acordo com as sugeridas por Remington et al., 2001, para o tratamento de gestantes, levando-se em consideração o peso aproximado de uma fêmea de *C. callosus* prenhe.

3.5. Sacrifício e coleta do material

Fêmeas prenhes de todos os grupos foram sacrificadas do 17º ao 20º dia de gestação. Na data do sacrifício, as fêmeas foram anestesiadas, por inalação de 0,1ml de mistura (1:1) de cetamina (Ketalar, Bayer S.A., São Paulo) e 2% de cloridrato de 2-(2,6 xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun, Bayer S.A., São Paulo), sangradas via plexo orbital com auxílio de capilar de vidro, para obtenção de amostras de soros para análises e, posteriormente foram sacrificadas, por deslocamento cervical. Sofreram laparatomização, para remoção do útero e subseqüentes coletas de embriões, que foram processados para análise morfológica, imunocitoquímica e bioensaio.

Embriões destinados ao bioensaio, antes da coleta do fígado e encéfalo, sofreram incisão próxima à região cardíaca e tiveram amostras de sangue coletadas, com auxílio de pipeta, para análises sorológicas.

Já os embriões destinados à análises morfológicas e imunocitoquímicas, foram fixados em formol 10% em tampão PBS 0,2M, pH 7,4, por 24 horas e depois mantidos em álcool 70% até o processamento.

3.6. Processamento do material para análise morfológica

Os embriões coletados foram desidratados, seguindo concentrações crescentes de álcool e, posteriormente incluídos em parafina. Cortes de 5µm foram depositados em lâminas. Depois foram desparafinizados, hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e por fim em água corrente, e foram corados com Hematoxilina – Eosina. As lâminas foram montadas, analisadas e fotografadas em fotomicroscópio de luz REICHERT-JUNG-POLIVAR (Lab. Óptica Robert KOCH, Áustria).

3.7. Processamento do material para análise imunocitoquímica

Os embriões foram processados rotineiramente para inclusão em parafina. Os cortes de 5µm foram depositados em lâminas previamente recobertas com solução aderente de polivinil acrílico (PVA). Depois foram desparafinizados e hidratados.

Feito isto, os cortes foram incubados por 8 minutos em solução de ácido acético à 5%, para bloqueio da fosfatase endógena, em seguida lavados em água corrente e em solução salina tamponada com TRIS 0,05M, pH 7,4 (TBS), por 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro normal de cabra à 2,5% em TBS, por 45 minutos à 37°C. Posteriormente fez-se a incubação do material com o anticorpo primário: policlonal de coelho dirigido contra *T. gondii* (produzido e cedido pelo Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia – Lab ImUFU), na diluição de 1 :100 em TBS por 12 horas à 4°C. Após sucessivas lavagens em TBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário: soro de cabra anti-IgG de coelho biotilado (Sigma, St Louis, USA), na diluição de 1:600 em TBS, por 1 hora à 37°C. Após sucessivas lavagens, a reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC)-fosfatase (Biomeda, Foster city, USA), na diluição de 1:100 em TBS, à 37°C por 30 minutos. Após novas lavagens em TBS, procedeu-se a revelação da enzima fosfatase alcalina com FastRed-naftol (Sigma, St Louis, USA), em TBS. Posteriormente os cortes foram lavados em TBS e água corrente e contra-corados com hematoxilina de Meyer, por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a diferenciação do corante em água amoniacal, as lâminas foram montadas com laminulas em

glicerina e o material foi analisado e fotografado em fotomicroscópio de luz REICHERT-JUNG-POLYVAR (Lab. Óptica Robert KOCH, Áustria).

Além dessa reação clássica para imunolocalização de *T. gondii*, foi realizada imunocitoquímica para detecção de anticorpos específicos da forma infectante bradizoíta. Nesse caso, os anticorpos utilizados foram: policlonal de coelho anti-BAG5, na diluição de 1:1000 em TBS (Lab ImUFU), e soro de cabra anti-IgG de coelho biotilado, na diluição de 1:600 em TBS (Sigma, St Louis, USA), anticorpos primário e secundário, respectivamente.

3.8. Bioensaio

Tecidos fetais (fígado e encéfalo), provenientes de fêmeas dos grupos tratamento e controle 1, foram removidos sob condições estéreis, homogeneizados em 1ml de PBS, pH 7,2 e inoculados, intraperitonealmente em camundongos Swiss, com sorologia negativa para *T. gondii*. Os animais foram sangrados com 15, 30 e 45 dias pós-inóculo. Foram feitas análises sorológicas, por teste ELISA, para verificação da soroconversão desses animais.

3.9. Determinação da carga parasitária

As lâminas histológicas, provenientes das reações imunocitoquímicas, foram analisadas por imagens digitalizadas em microscópio óptico BX40, da marca Olympus, com uso de objetiva de 40x, acoplado a uma câmera JVC TK-1085U, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora "Traslation" 3153. Foi utilizado o programa HL Image 97⁺⁺ para mensuração da carga parasitária.

Dois cortes de embrião por fêmea, foram analisados, sendo digitalizadas 60 imagens por corte. As imagens eram obtidas aleatoriamente e tinham área definida de 0,01872mm². As imunomarcações encontradas forneceram um valor absoluto por embrião. Para correção desse valor, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de imunomarcações} / \text{mm}^2 = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de imunomarcações encontradas (valor absoluto)}}{0,01872 \times 60 (\text{n}^{\circ} \text{ de imagens} / \text{corte})}$$

Os valores reais por corte foram somados, obtendo-se então o número de imunomarcações/mm² para cada embrião.

3.10. Teste imunoenzimático: ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*

Os soros provenientes de todas as sangrias foram submetidos à análise pelo teste-ELISA, de acordo com Ferro (2000), para obtenção do índice ELISA.

- **Teste-ELISA e índice ELISA (IE):**

Placas de poliestireno (Kartell S.P.A., Noviglio, Milão, Itália), foram sensibilizadas com antígeno solúvel da cepa RH de *T. gondii* a uma concentração protéica de 10 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato de sódio a 0,06M, pH 9,6, por 18 horas à 4°C (“overnight”). No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBST), por três ciclos de 5 minutos. Foram adicionados 50 µl/poço das amostras de soros diluídas a 1:32 em PBST, em duplicata. Paralelamente, foram adicionados soros controles positivos e negativos nas mesmas diluições. Como controle do conjugado, foram omitidas as amostras de soros, adicionando-se no lugar 50µl de PBST. Após incubação de 1 hora à 37°C, as placas foram lavadas três vezes em PBST por 5 minutos. O conjugado ou anticorpo secundário (IgG de coelho anti-gamaglobulina de *C. callosus* marcada com peroxidase ou IgG de coelho anti-gamaglobulina de camundongo marcada com peroxidase), foi adicionado na diluição de 1:250 em PBST e as placas foram incubadas por 1 hora à 37°C. As placas foram então lavadas como descrito anteriormente e o substrato enzimático (solução reveladora), que consiste de peróxido de hidrogênio (água oxigenada), foi adicionada a 0,03% em tampão cromógeno OPD (ortofenilenodiamina, Merck) diluídos em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0. Após adição de solução reveladora, procedeu-se a incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, em câmara escura. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25µl de solução de ácido sulfúrico 2N. A densidade óptica foi determinada em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492nm.

Para análise individual das placas, os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), calculado a partir da fórmula:

$$\frac{\text{Densidade óptica das amostras (DOx)}}{\text{Valor do limiar de reatividade (cut off)}}$$

O *cut off* foi determinado pela média da absorbância de três controles negativos (X(P-)) para cada espécime, acrescido três vezes do desvio padrão (d).

3.11. Análises estatísticas

A eficiência do tratamento foi avaliada comparando-se as diferenças estatísticas da quantidade de imunomarcações (mm^2) entre os grupos, através do teste-*t* não paramétrico (Graph Pad software, v. 3.0, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos em valores de médias $\pm$ desvio padrão e diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises morfológicas

Todos os cortes de embriões analisados apresentaram morfologia preservada, ou seja, nenhuma alteração tecidual foi considerada anormal. Mesmo em órgãos mais comprometidos em infecções congênitas por *Toxoplasma gondii*, fígado e encéfalo (FERRO, 2002; FAVORETO-Jr, 1998; BARBOSA, 2004), independente do grupo experimental analisado, não se percebeu células e tecidos com aspectos morfológicos alterados.

Isso demonstra que, nesse caso, os embriões advindos do grupo controle 1, cujas mães foram infectadas e não tratadas, não apresentaram seqüelas visíveis em decorrência da infecção.

Além disso, foi possível perceber que os fármacos utilizados nesse experimento não afetaram a morfologia dos tecidos fetais, à medida que embriões provenientes do grupo controle 2, cujas mães receberam apenas tratamento, não apresentaram nenhum tipo de má formação.

4.2. Análises imunocitoquímicas

Definiu-se que as reações de imunocitoquímica clássica, por utilizar anticorpo primário policlonal de coelho anti-*T. gondii* produzido a partir da cepa RH de *T. gondii* durante a fase proliferativa do parasito, ao apresentar imunomarcações, essas foram específicas para a forma infectante taquizoíta. Enquanto que as reações realizadas com anticorpo primário policlonal de coelho anti-BAG5, foram específicas para marcação de bradizoítas (BOHNE et al., 1995).

Cortes de embriões dos grupos tratamento e controle 1, de todas as idades gestacionais analisadas (17, 18, 19 e 20 dias), quando processados para imunocitoquímica contra a forma proliferativa de *T. gondii* (taquizoíta), apresentaram-se multi-infectados, incluindo áreas como: fígado (Fig. 05A) e encéfalo (Fig. 05C).

Esses dados demonstram que a transmissão congênita ocorre independente da submissão dos animais ao tratamento, deixando claro que nessas condições, essas drogas não extinguem completamente o parasito dos tecidos fetais.

Nos casos de imunocitoquímica direcionada contra a forma infectante bradizoíta de *T. gondii*, as imunomarcações também foram percebidas tanto em tecidos fetais provenientes do

grupo controle 1, quanto dos animais que sofreram tratamento. Porém, nem todas as idades gestacionais apresentaram imunomarcações de bradizoítas, apenas em animais com 19 e 20 dias de gestação e inóculo, sendo que os parasitos foram encontrados exclusivamente no encéfalo (Fig. 05B e 05D).

A presença de bradizoítas demonstra que a partir do 19º dia de gestação/inóculo já pode estar iniciando a formação de cistos ou pseudocistos teciduais, indicando uma tendência de cronificação da doença (DUBEY, 2006), o que de maneira geral é interessante, pois no estágio crônico da doença, a transmissão vertical do parasito não existe, ou é mínima, diminuindo a carga parasitária transmitida ao feto e conseqüentemente a frequência e severidade de seqüelas para o mesmo (JEFFREY et al., 2005; RORMAN et al., 2005; REMINGTON et al., 2001).



Figura 05. Fotomicrografia de tecidos fetais de *Calomys callosus* com 19 dias de gestação e inóculo com *Toxoplasma gondii*. (A) e (B), fígado e encéfalo de animais não tratados, com taquizoítas (setas) e bradizoítas (cabeças de setas). (C) e (D), taquizoítas (setas) e bradizoítas (cabeças de setas), em encéfalos de animais após 5 dias de tratamento com associação de fármacos (sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico). Imunocitoquímica, contracorado com hematoxilina de Mayer, 520X.

- **Imunomarcações (mm^2) nos grupos controle 1 e tratamento**

A partir da contagem de imunomarcações, percebeu-se que em ambos os grupos, controle 1 e tratamento, os embriões apresentaram número maior de imunomarcações para taquizoítas do que para bradizoítas (Fig. 06), o que retrata bem o padrão de infecção aguda com discreta tendência à cronificação, à medida que mais formas proliferativas (taquizoítas) do parasito são encontrados em relação às formas de encistamento (bradizoítas) (FERGUSON, 2004).

Comparando os grupos controle 1 e tratamento, foi possível perceber que a quantidade de imunomarcações (mm^2) para taquizoítas é maior no primeiro grupo em relação ao segundo (Fig. 06).

Esse resultado demonstra que o tratamento é capaz de diminuir a transmissão materno-fetal de taquizoítas, o que pode ser atribuído a ação antifolato da combinação dos fármacos sulfadiazina e pirimetamina, impedindo que a síntese de folato e conseqüentemente de DNA do parasito seja completada, logo o mesmo se replica com dificuldade (KATZUNG, 2005; RANG et al., 2003; GOOLDMAN, GILMAN, 2001).

Essa queda no número de marcações para *T. gondii* em embriões de fêmeas tratadas, sugere que os fármacos utilizados nesse trabalho têm capacidade de transpor a barreira placentária, expondo os tecidos fetais a seus efeitos terapêuticos, influenciando na diminuição da carga parasitária nos mesmos.

Já quando se compara o número de imunomarcações (mm^2) de bradizoítas, percebe-se que o grupo controle 1 apresenta uma quantidade menor em relação ao grupo tratamento (Fig. 06).

A partir desses dados, pode-se demonstrar que embriões provenientes de mães tratadas apresentam um processo de tendência de cronificação da doença mais precocemente, o que pode ser visto como uma tentativa de promover o encistamento do parasito nos tecidos fetais e conseqüentemente diminuir ou extinguir as possíveis seqüelas para o conceito.

Vários fatores podem gerar um estresse acentuado ao parasito, fazendo com que o mesmo se diferencie rapidamente de taquizoíta para bradizoíta, formando posteriormente os cistos teciduais, isso pode garantir uma sobrevivência maior para o protozoário nos tecidos de seus hospedeiros (WEISS, KIM, 2000; LYONS et al., 2002). A terapêutica utilizada nesse experimento pode ter produzido esse “sinal” de mudança de forma infectante.

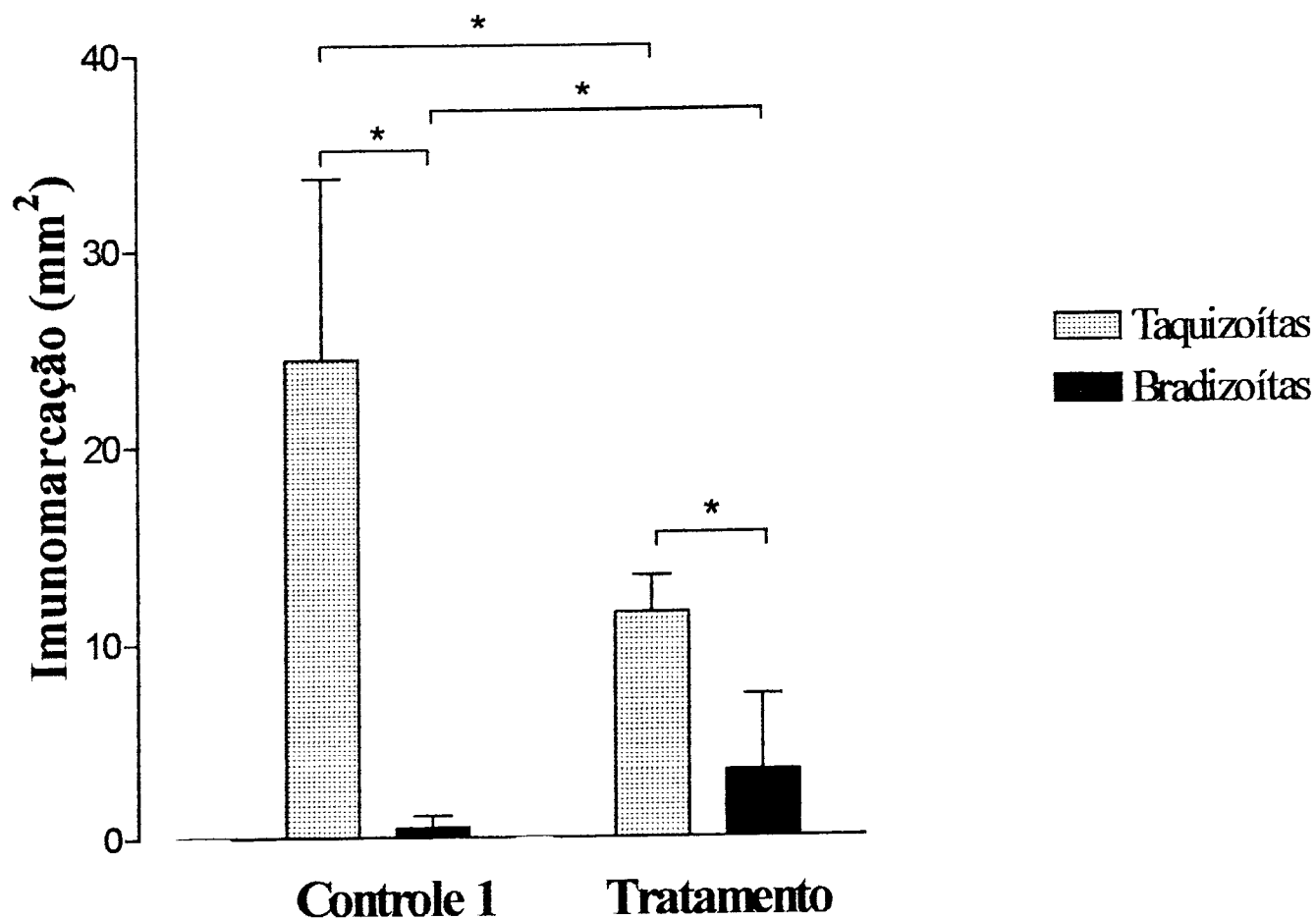


Figura 06. Imunomarcações (mm²) de taquizoítas e bradizoítas em tecidos fetais de *Calomys callosus* provenientes de mães infectadas com 20 cistos da cepa Me49 de *Toxoplasma gondii* sem receber tratamento (grupo controle 1) ou tratadas com associação de fármacos – sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (grupo tratamento). Resultados expressos por médias $\pm$ desvio padrão. * $P < 0,05$.

- **Imunomarcações (mm^2) nos grupos controle 1 e tratamento de acordo com a idade gestacional**

Somente a partir do 19º dia de gestação e inóculo das fêmeas foi observada diferença significativa no número de imunomarcações (mm^2) de taquizoítas entre os grupos (Fig. 07). É possível notar que a quantidade de taquizoítas é consideravelmente maior em embriões do grupo controle 1 em relação aos do grupo tratamento, tanto no 19º quanto no 20º dia de gestação/inóculo, atingindo maior pico de diferença no último dia de sacrifício (Fig. 07). Logo, percebe-se que a falta do tratamento permite que um número maior de taquizoítas infecte os tecidos fetais o que pode ocasionar severas lesões congênitas para o neonato (MONTROYA, LIESENFELD, 2004).

Foi também no 20º dia de gestação e inóculo das fêmeas que se percebeu diferença significativa entre a quantidade de imunomarcações (mm^2) de bradizoítas entre os grupos, sendo que esse número foi maior para animais do grupo tratamento do que para os do grupo controle 1 (Fig. 07). Nos primeiros dias de gestação e inóculo analisados (17 e 18) não se observou imunomarcações para bradizoítas em ambos os grupos (Fig. 07). Já no 19º dia de gestação essa situação é diferente (Fig. 07). Pode-se dizer que há uma tendência natural de início de cronificação da toxoplasmose no final da gestação em *Calomys callosus*, e que com a intervenção terapêutica, esse perfil se fortalece ainda mais. Isso se dá provavelmente, porque essa foi a última data gestacional analisada, portanto, parasitos encontrados em embriões cujas mães foram sacrificadas no 20º dia de gestação/inóculo, foram submetidos a mais adversidades em decorrência da terapêutica, sendo induzidos a diferenciação mais rápida de taquizoítas para bradizoítas (DUBEY et al., 1998).

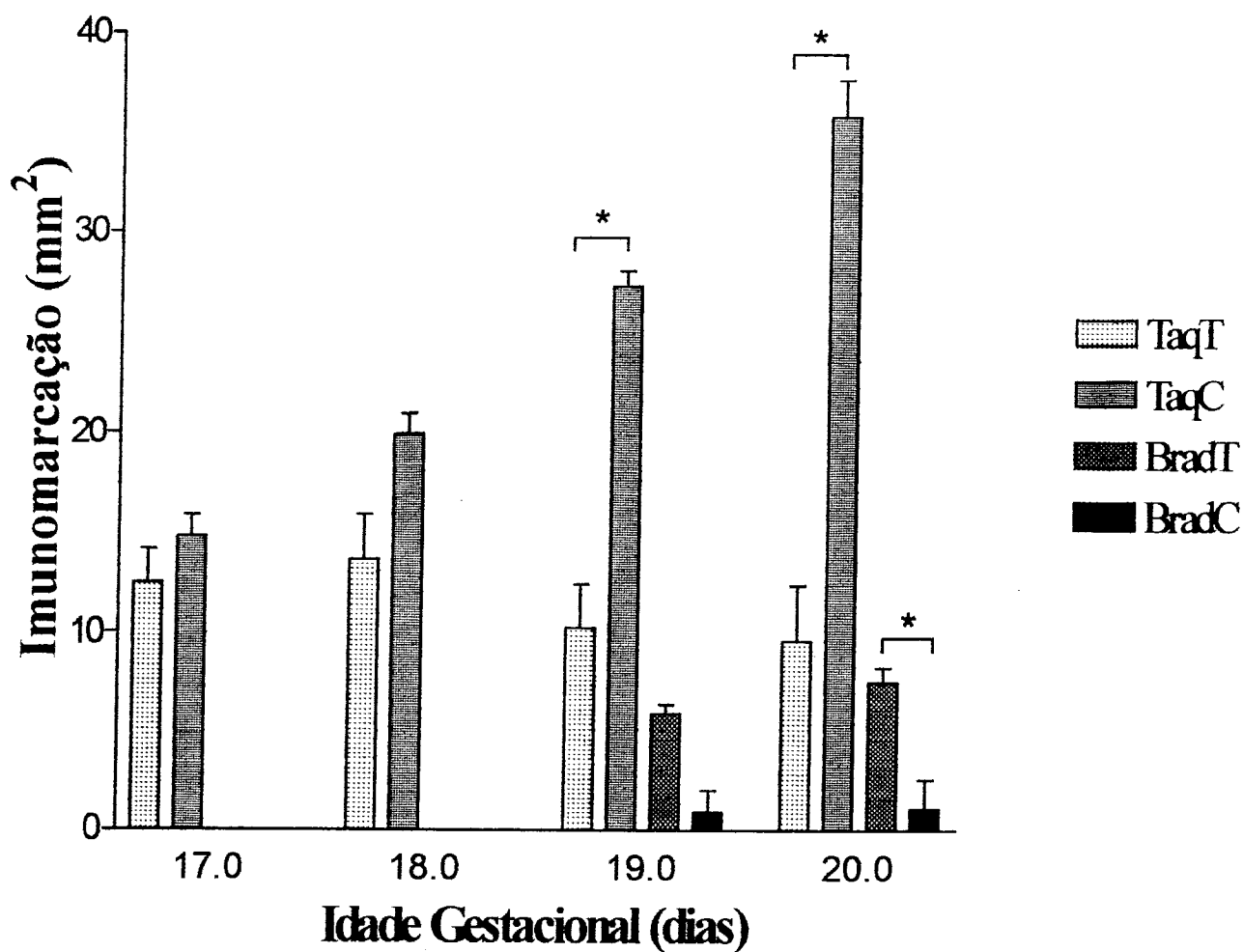


Figura 07. Imunomarcações (mm^2) de taquizoítas e bradizoítas em tecidos fetais de *Calomys callosus* de acordo com a idade gestacional em dias, cujas mães receberam 20 cistos da ccpa Me49 de *Toxoplasma gondii* e não foram tratadas (grupo controle 1) ou sofreram tratamento com associação de fármacos – sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (grupo tratamento). Resultados expressos por médias $\pm$ desvio padrão. * $P < 0,05$.

Onde: TaqT = imunomarcações de taquizoítas para o grupo tratamento;

TaqC = imunomarcações de taquizoítas para o grupo controle 1;

BradT = imunomarcações de bradizoítas para o grupo tratamento;

BradC = imunomarcações de bradizoítas para o grupo controle 1.

4.3. Análises sorológicas

Fêmeas provenientes de todos os grupos apresentaram-se soronegativas para anticorpos anti-*T. gondii* no primeiro dia de gestação. Já na data do sacrifício fêmeas dos grupos tratamento e controle 1 haviam se soroconvertido, enquanto que as fêmeas do grupo controle 2 mantiveram o perfil do 1º dia de gestação.

Todas as amostras de soros provenientes dos embriões mostraram-se positivas no teste-ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, sugerindo que a transmissão de Imunoglobulinas G da mãe para o feto ocorreu.

As amostras de soros advindas dos camundongos do bioensaio apresentaram-se soronegativas no dia do inóculo, porém, posteriormente todos esses animais mostraram-se positivos para anticorpos anti-*T. gondii* no teste-ELISA em sangrias subseqüentes. Os camundongos que receberam inóculo de tecidos fetais de mães do grupo controle 1, apresentaram soroc conversão mais precocemente quando comparados com aqueles receptores de tecidos fetais de mães do grupo tratamento (Fig. 08). Em relação a animais que receberam inóculo provenientes do grupo controle 1, com menor idade gestacional (17 dias), a soroc conversão ocorreu apenas a partir da segunda sangria, enquanto que inóculo com tecidos de outras idades (18, 19 e 20 dias) já era capaz de produzir amostras de soros positivas na primeira sangria (Fig. 08).

No que diz respeito ao grupo tratamento a soroconversão dos camundongos deu-se mais tardiamente. Infecção com tecidos fetais mais jovens (17 e 18 dias) promoveu a positividade das amostras a partir da segunda sangria, já inóculo com tecidos de 19 e 20 dias só foi capaz de soroconverter os camundongos na terceira sangria (Fig. 08).

Esses resultados reforçam a idéia de que o tratamento não impede a passagem de parasitos da mãe para o feto, apenas combate a multiplicação dos mesmos (RANG et al., 2003). Além disso, eles expressam que a diferenciação de forma infectante de taquizoíta para bradizoíta nos embriões em decorrência do tratamento, fez com que os camundongos inoculados com esses tecidos apresentem uma soroconversão mais tardia, uma vez que os parasitos teriam que sofrer uma nova diferenciação (bradizoíta para taquizoíta) para instalar a infecção nesses animais.

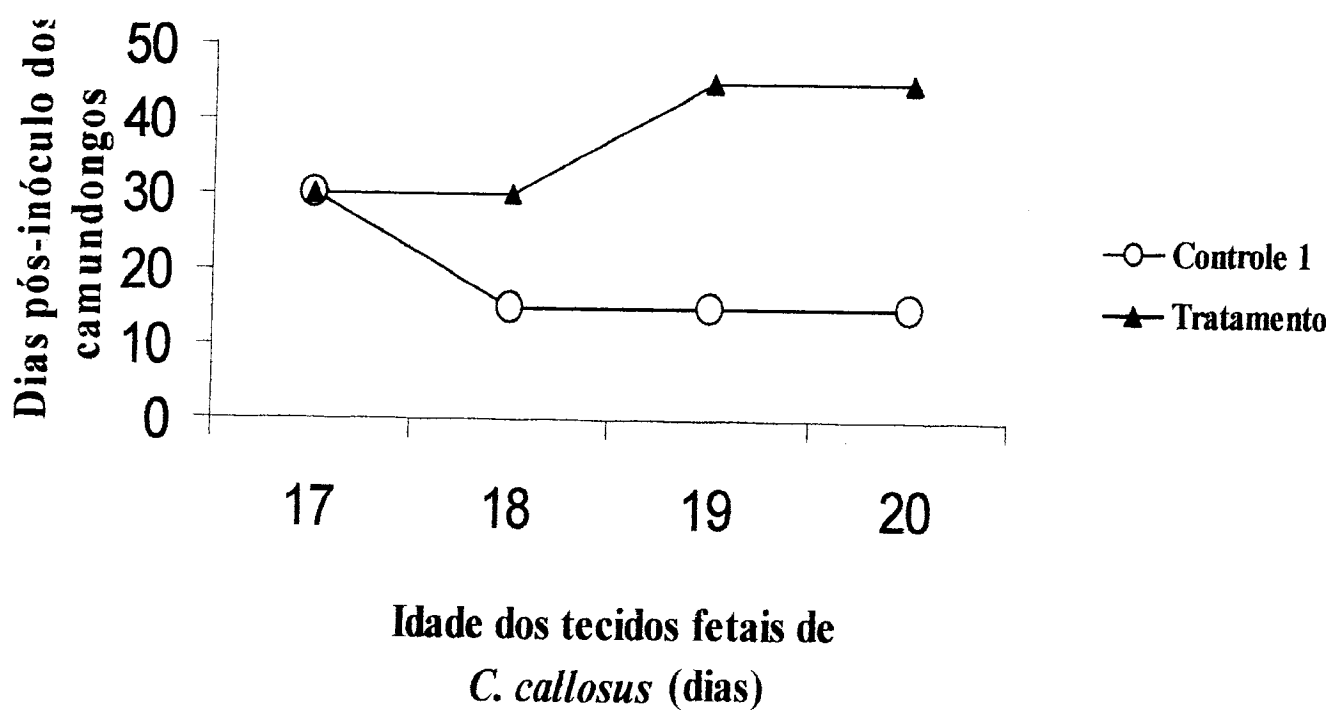


Figura 08. Período de sangria que demonstra a soroconversão de camundongos que receberam inóculo de tecidos fetais de *Calomys callosus* provenientes de mães infectadas com 20 cistos da cepa Me49 de *Toxoplasma gondii* e foram tratadas com associação de fármacos – sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (grupo tratamento) ou não (grupo controle 1).

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados anteriormente, pode-se concluir que nesse modelo experimental:

- infecção congênita por *Toxoplasma gondii* e tratamento da doença não são capazes de induzir alterações morfológicas visíveis em embriões de *Calomys callosus*, uma vez que tecidos fetais provenientes de todos os grupos analisados (tratamento, controle 1 e controle 2) não apresentaram nenhum tipo de alteração tecidual;
- o tratamento com SPA mostrou-se eficaz pois parece provocar um estresse acentuado para o parasito levando a uma rápida diferenciação para a forma bradizoíta, a qual apresenta maior número de imunomarcações (mm^2) em tecidos fetais do grupo tratamento em relação ao grupo controle 1. Além disso, foi capaz de diminuir a quantidade de imunomarcações (mm^2) de taquizoítas em embriões do grupo tratamento quando comparados aos do grupo controle 1;
- todas as fêmeas dos grupos tratamento e controle 1 mostraram-se soronegativas para toxoplasmose no primeiro dia de gestação, porém no dia do sacrifício já apresentaram positividade para anticorpos anti-*T. gondii*, demonstrando que a infecção das mesmas ocorreu de fato;
- a transmissão de IgG anti-*T. gondii*, das mães para os fetos ocorreu, uma vez que todas as amostras de soro provenientes de embriões foram positivas para esses anticorpos;
- tecidos fetais advindos do grupo tratamento, induzem soroconversão em camundongos do bioensaio mais tardiamente quando comparados com aqueles do grupo controle 1, reafirmando que a carga parasitária do primeiro grupo é menor do que no segundo.

Portanto, *Calomys callosus* além de ser um bom modelo experimental para transmissão vertical de *Toxoplasma gondii*, uma vez que simula a situação observada em humanos, mostrou-se apto para realização de estudos relacionados à utilização de fármacos no tratamento da toxoplasmose congênita.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v. 155, n. 4, p. 224-225, 1995.
- ARAUJO, F. G.; SLIFER, T. Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4171-4174, 2003.
- AVELINO, M. M.; CAMPOS, D. Jr.; PARADA, J. B.; CASTRO, A. M. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 164-174, 2004.
- BARBOSA, B. F. A transmissão congênita de toxoplasmose em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) é dependente do tempo de infecção materna. (Monografia). Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2004.
- BEAZLEY, D. M. & EGERMAN, R. S. Toxoplasmosis. **Seminars in perinatology**, v. 2, p. 332-338, 1998.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.
- BOHNE, W.; GROSS, U.; FERGUSON, D. J. P.; HEESEMANN, J. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hs 30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1221-1230, 1995.
- BONHOMME, R.; PINGRET, L.; PINON, J. M. *Toxoplasma gondii* cellular invasion. **Review Parasitology**, v. 34, p. 31-43, 1992.

¹ De acordo com as normas da ABNT NBR 6023: 2002

- BOYER, K. M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISGER, C.; MACK, D.; REMINGTON, J.; WITHERS, S.; MEIER, P.; McLEOD, R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, p. 564-571, 2005.
- BRAZ, L. M. A.; PIETRO, A. O. D.; NETO, V. A.; FRANÇA, F. O. S. Evaluation of the efficacy of azithromycin and pyrimethamine, alone or in combination, for the treatment of experimental infection of mice with *Toxoplasma gondii*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32; n. 4, p. 401-403, 1999.
- BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. **Drugs in Pregnancy and Lactation. A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk**. 6ª ed - Willians & Wilkins, 2002.
- CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, p. 111-122, 2002.
- CHEMLA, C.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; HORNOY, P.; DUPOVY, D.; LEROUX, B.; BORY, J. P.; PINON, J. M. Preconception seroconversion and maternal seroconversion at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 489-490, 2002.
- DOLLFUS, H.; DUREAU, P.; HENNEQUIN, C.; UTEZA, Y.; BRON, A.; DUFIER, J. L. Congenital toxoplasma chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune women. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 82, n. 12, p. 1444-1445, 1998.
- DOMAGK, G. Experimental bases in chemotherapy of bacterial infectious with sulfonamides and related substances with special reference to its application in surgery. **Langenbecks Archiv fur Klinische Chirurgie Vereinigt mit Deutsche Zeitschrift fur Chirurgie**, v. 11, n. 264, p. 102-123, 1950.
- DUBEY, J. P. & BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. 1ª ed. Boca Raton – Florida: CRC Press, 1988.

- DUBEY, J. P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 69-75, 2006.
- DUBEY, J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **Journal for Parasitology**, n. 87, p. 215-219, 2001.
- DUBEY, J. P. Tachyzoite – induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **Journal for Parasitology**, v. 88, p. 713-717, 2002.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57-72, 2004.
- DUBEY, J. P. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation. **Veterinary Parasitology**, v. 133, p. 289-298, 2005.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii*: tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.
- FARHAT, C. K.; CARVALHO, E. S.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. **Infectologia Pediátrica**. 2ª ed. Editora: Atheneu. São Paulo, 1998.
- FAVORETO-Jr, S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 103-107, 1998.
- FERGUSON, D. J. P. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 347-360, 2004.

- FERRO, E. A. V. **Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus***. 2000. 147f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.
- FERRO, E. A. V.; SILVA, D. A. O.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7089-7094, 2002.
- FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around us. **Bioscience**, v. 23, n. 3, p. 343-352, 1973.
- GAZZINELLI, R. T.; ELTOUM, I.; WYNN, T. A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **The Journal of Immunology**, v. 11, n. 7, p. 3672-3681, 1993.
- GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed. Editora: McGraw-Hill. Rio de Janeiro, 2001.
- GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, p. 161-165, 2001.
- GROSS, U.; BOHNE, W.; SOËTE, M.; DUBREMETZ, J. F. Developmental differentiation, between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 12, n. 1, p. 30-33, 1996.
- GRUJIC, J.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; NIKOLIC, A.; KLUN, I.; BOBIC, B. Effectiveness of spiramycin in murine of acute and chronic toxoplasmosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 3, n. 25, p. 226-230, 2004.
- HALL, S. M. Congenital toxoplasmosis. **Medical Journal**, v. 305, p. 291-297, 1992.

- HOWE, D. K.; SIBLEY, D. L. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infection Disease**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.
- JACKSON, M. H. & HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55-105, 1989.
- JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 46, p. 11-21, 1960.
- JEFFREY, D.; KRAVETZ, M. D.; DANIEL G. FEDERMAN, M. D. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, v. 118, p. 212-216, 2005.
- JOHNSON, K. M.; MACKENZIE, R. B.; WEBB, P. A.; KUNS, M. L. Chronic infection of rodents by Machupo virus. **Science**, v. 150, n. 703, p. 1618-1619, 1965.
- JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetric Gynecology Survival**, v. 56, p. 296-305, 2001.
- JUSTINES, G.; JOHNSON, K. M. Immune tolerance in *Calomys callosus* infected with Machupo virus. **Nature**, v. 222, n. 198, p. 1090-1091, 1969.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9ª ed. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2005.
- KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. et al., **Parasitologia Humana**. Ed.: Atheneu. 10ª ed. São Paulo, 2002, p. 147-156.
- KOREN, G.; PASTUSZAK, A.; ITO, E. Drugs in pregnancy. **The New England Journal of Medicine**, v. 16, n. 338, p. 1128-1137, 1998.
- LEBECH, M.; JOYNSON, D. H.; SEITZ, H. M.; THULLIEZ, P.; GILBERT, R. E.; DUTTON, G. N.; OVLISEN, B.; PETERSEN, E. Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally

- infected offspring. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. 799-805, 1996.
- LUNDE, M. N.; JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 69, n. 5, p. 806-808, 1983.
- LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii*: tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitology**, v. 18, p. 198-201, 2002.
- McLEOD, R.; MACK, D. & BROWN, C. *Toxoplasma gondii* – new advances in cellular and molecular biology – mini review. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 109-121, 1991.
- MELLO, D. A. Note on greeding of *Calomys expulsus*, Lund, 1841 (Rodentia, cricetidae) under laboratory condition. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v. 10, n. 2, 1997.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MOZZATTO, L. & PROCIANOY, R. S. Incidence of congenital toxoplasmosis in Southern Brazil: a prospective study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 3, p. 147-151, 2003.
- NAESSENS, A.; JENUM, P. A.; POLLAK, A.; DECOSTER, A.; LAPPALAINEN, M.; VILLENA, I.; LEBECH, M.; STRAY-PEDERSEN, B.; HAYDE, M.; PINON, J. M.; PETERSEN, E.; FOULON, W. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. **The Journal of Pediatrics**, v. 135, n. 6, p. 714-719, 1999.
- NETO, V. A.; CAMPOS, R.; BARUZZI, R. G.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**, v X, SARVIER, p. 158. São Paulo, 1982.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Su rune infection à corps de Leishman (ou organisms voifins) du gondi. **Compte Rend Academy Science Paris**, v. 147, p. 763-766, 1908.

- ODEH, M. The role of tumour necrosis factor-alpha in the pathogenesis of complicated falciparum malaria. **Cytokine**, v. 14, p. 11-18, 2001.
- PEREIRA, M. F.; SILVA, D. A. O.; FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R. Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-114, 1999.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Pharmacology**. 5^a ed. Elsevier (USA), 2003.
- REMYINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONT, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON & KLEIN. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 5^a ed. Philadelphia, WB, Saunders, 2001, p. 205-345.
- REY, L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: REY, L. **Parasitologia**. Ed.: Guanabara Koogan. 3^a ed. Rio de Janeiro, 2001, p. 321-334.
- RIBEIRO, R. D. Novos reservatórios de *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 33, n. 3, p. 429-437, 1973.
- RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; DAVID-BEN, H. Congenital toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, n. 21, p. 458-472, 2005.
- SEGAL, S.; HILL, A. V. S. Genetic susceptibility to infectious disease. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 445-448, 2003.
- SILVEIRA, C.; FERREIRA, R.; MÚCCIOLI, C.; NUSSENBLATT, R.; BELFORT, R. Jr. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n. 2, p. 370-371, 2003.
- SMITH, E. J. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n.11, p. 1301-1309, 1995.

- SPEER, C. A.; TILLEY, M.; TEMPLE, M. E.; BLIXT, J. A.; DUBEY, J. P. & WHITE, M. W. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 75, p. 75-86, 1995.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 2ª ed. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1999.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parasita dei conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. *Revista da Academia de Ciências (São Paulo)*, v. 3, p. 109-112, 1908.
- WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Bioscience*, v. 5, p. 391-405, 2000.