



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Avaliação da eficácia dos tratamentos com a associação de
Sulfadiazina, Pirimetamina e Ácido folínico (SPAF),
Azitromicina, infusão de *Artemisia annua* L. e Espiramicina
na prevenção da transmissão vertical da toxoplasmose em
Calomys callosus (Rodentia: Cricetidae)**

IDESSANIA NAZARETH COSTA

Uberlândia

Abril - 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Avaliação da eficácia dos tratamentos com a associação de
Sulfadiazina, Pirimetamina e Ácido folínico (SPAF),
Azitromicina, infusão de *Artemisia annua* L. e Espiramicina
na prevenção da transmissão vertical da toxoplasmose em
Calomys callosus (Rodentia: Cricetidae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor

Doutoranda: Idessania Nazareth Costa

Orientadora: Prof. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia

Abril -2009

"Se....

Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de
amar a vida...

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem...

A capacidade de escolher novos rumos...

Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho.

Além do trabalho, a ação.

E quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída."

Gandhi

" O homem desesperado alcançou , um dia, a presença do Cristo e clamou:

-Senhor, que fazer para sair do labirinto da Terra? Tudo
sombra....maldade e indiferença, angústia e aflição dominam as criaturas que, a
meu ver, se debatem num mar de trevas...Senhor, onde o caminho que me
assegure a libertação?

Jesus afagou o infeliz e respondeu generosamente:

-Filho, ninguém te impede de acender a própria luz."

Emmanuel

Para todos os seres admiráveis que de alguma forma, conseguem transpor as
barreiras das limitações, quaisquer que sejam, não perdem tempo com questões
periféricas e direcionam seu viver em função do título que fazem jus em
receber.

Idessania.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

À você mãezinha Nair Nazareth Costa, dedico este trabalho na certeza de que mesmo vivendo em mundos diferentes, estamos unidas pelos laços infinitos do amor!!!
Obrigada. Devo tudo à senhora...Te amo!

"Mãe,

Obrigada por ter me dado o seu sangue, sua alma, suas noites, suas lágrimas, seu sorriso, sua esperança, sua expectativa, seu sacrifício.

Obrigada mãe, por ter me deixado nascer, por conhecer a luz da vida nas trevas do mundo, conhecer um anjo de luz que se chama: Mãe!!"

Scheilla

Livro: "Só o Amor Liberta"- Shyrlene Campos

DEDICO AINDA....

Ao meu paizão, João Geraldo Costa, pelo seu esforço permanente e dedicação ao trabalho para que me fosse sempre permitido estudar...

Ao meu querido irmão Risley Costa, exemplo de coragem, que é meu rouxinol carinho em todos os momentos.

À minha amada madrinha Nazir Nazareth, cujo exemplo e força de vida me inspiram constantemente.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, Pai de infinito Amor e bondade, por me ter concedido a dádiva de viver e conviver com pessoas maravilhosas que só me enriquecem a alma.

À você, **Eloisa Ferro**, que desde o primeiro dia que lhe pedi orientação, me recebeu de braços abertos e com muita alegria me acolheu no laboratório, mostrando ser, além da excepcional profissional que é, uma pessoa que consegue perceber o potencial e as limitações de cada um e acima de tudo, valoriza o que há de melhor em nós, nos trata com o mesmo respeito, a mesma dedicação e sinceridade, sendo o apoio não só científico mas aquela força que se estende e rompe as barreiras acadêmicas para deixar marcas de profunda gratidão em nossas almas.

Especialmente, lhe agradeço também por ter me presenteado com a idéia deste projeto e por ter acompanhado de perto a realização e a concretização do mesmo. Você não foi apenas minha orientadora. Obrigada por tudo!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu co-orientador Dr. **José Roberto Mineo** que com certeza, contribuiu muito, desde a graduação, para minha formação profissional e pessoal, com seu exemplo de sensatez, dedicação e experiência.

À Dra. **Deise Silva Oliveira**, pessoa linda, pesquisadora, amiga e de uma competência sem limites, capaz de se desdobrar e ajudar à todos da mesma forma.

À Dra. **Neide Silva** pelo seu carinho, respeito e capacidade de enxergar em cada um a possibilidade de oferecermos o nosso melhor.

Ao Dr. **Marcelo Beletti** e Dra. **Janethe Pena** pelas sugestões pertinentes no trabalho, pela convivência, pela ajuda, sugestões e por serem tão solícitos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrado aqui, minha sincera gratidão à vocês:

-À minha família, particularmente tias Zica e Ninica, pela ajuda indescritível nos últimos meses, e também à todos meus primos.

-À banca examinadora pelas correções deste trabalho, pelas sugestões, por doarem seu tempo em prol desta causa.

-Aos professores da Histologia, Paula Dechichi, Marcos Silva, Gladstone e Marco Aurélio, pessoas e profissionais fantásticos que se destacam pela competência e humildade.

-Aos professores Paulo Rogério e Alberto. À professora Karen cuja simplicidade e carisma cativa a todos nós. Obrigada por tudo.

-À querida Juscélia, secretária da Histologia, que muitas vezes assumiu o papel de mãe...sempre com uma palavra de conforto, fé...e que foram meu consolo em momentos de dor...Gosto demais de você.

-Aos funcionários Rui, Hégio pela ajuda prestada sendo importantíssimos principalmente no início desse projeto.

-Aos técnicos Marcelo e Fabrício pela imensa solicitude e ao Richard pela atenção.

-Às minhas amigas fiéis e prestimosas:

-Angelica, cujo nome reflete a doçura e a simplicidade da sua pessoa.

-Bellisa, companheira de lutas, estudos e de alegrias.

-Mariana Bodini, sinônimo de sensatez e companheirismo.

-Lorena Almeida, que sutilmente, sempre nos faz rir de alguma coisa.

É importante que saibam que sem a cooperação de vocês desde o meu ingresso no laboratório até os dias atuais, eu não teria conseguido. Vocês fizeram e fazem a diferença. Trabalham em equipe e serei grata eternamente por toda ajuda em todos os campos. Minha ternura.

-Às "minhas meninas queridas" :

-Loyane, Adele, Milena e Priscila, sem vocês tudo seria mais difícil. Obrigada pelo apoio de sempre.

-À Letícia, Andressa, Ester, Paulo, Rosiane, Diego, Flávia, Mayara e Janice pelo carinho e pelo auxílio.

-Aos amigos Gustavo, Andréa e Flaviane pelos momentos de descontração.

-Aos professores da Imunologia pelo profissionalismo. Especialmente ao Dr. Jair Junior, exemplo de competência e solidariedade.

-Aos amigos valiosos da Imunologia....e especialmente à Ana Claudia e Marley pelo auxílio nos experimentos e à Cristina Rostkowsa por ter cedido gentilmente a planta *Artemisia annua*.

-Às amigas Eneida, Taísa e Rosângela...valeu demais.

-À Carla duque que no início do projeto foi uma colaboradora prestimosa.

-À todos colegas da Pós-graduação.

-À secretaria da Pós-graduação, particularmente aos secretários Neto, Lucileide e Lucélia, amigos solícitos e cooperadores amoráveis.

-Aos amigos incondicionais do Núcleo Servos Maria de Nazaré....Em especial, Franklin e também ao casal Shyrlene Campos e José Oliveira Campos, cujo exemplo de viver me estimulam a vida, à luta, enfim em pensar que vale à pena seguir sempre adiante com Deus. Minha eterna gratidão.

-À querida Gessi pelas preces, pela força ilimitada. Foi e é a amiga-mãe prestimosa. Será sempre lembrada com todo meu carinho e gratidão.

-À família França por cederem gentilmente seu lar para a realização da redação da tese e pela contribuição na formatação do trabalho e apoio em diversos momentos...

-Agradeço em especial aos animais utilizados neste estudo cuja vida de sacrifício deve ser no mínimo respeitada.

- À FAPEMIG, pelo apoio financeiro oferecido durante este curso.

Á todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.
Obrigada!!!!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos Taxonômicos e epidemiológicos de <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2. Aspectos Morfobiológicos e ultraestruturais de <i>T. gondii</i>	3
1.3. Formas infectantes	5
1.4. Ciclo biológico	7
1.5. Linhagens Clonais de <i>T. gondii</i>	9
1.6. Patogenia, resposta imune e diagnóstico da toxoplasmose	11
1.7. Terapêutica da Toxoplasmose	15
1.7.1. Uso de medicamentos no período gestacional	17
1.7.2. Espiramicina	18
1.7.3. Sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico	19
1.7.4. <i>Artemisia annua</i> L.	22
1.7.5. Azitromicina	24
1.8. <i>Calomys callosus</i>	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Animais de Experimentação	29
3.2. Manutenção da cepa ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
3.3. Acasalamento, detecção de prenhez e inoculação de <i>T. gondii</i>	30
3.4. Tratamento	31
3.4.1. Animais tratados com Associação de drogas- SPAF (Sulfadiazina, Pirimetamina e Ácido folínico)	31
3.4.2. Animais tratados com Azitromicina	32
3.4.3 - Infusão de <i>A. annua</i>	32
3.4.4. Animais tratados com Espiramicina	32
3.4.5. Animais controle	33
3.5. Coleta do material	33
3.6. Bioensaio	34

3.7. Processamento do material para análise morfológica.....	34
3.8. Processamento do material para estudo imunohistoquímico.....	34
3.9. Reação de PCR	36
3.10. ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	36
3.11. Normas de Biossegurança	37
3.12. Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1 - Teste ELISA para <i>C. callosus</i>	38
4.2 - Análise morfológica de tecidos placentários e fetais de <i>C. callosus</i>	38
4.3. Análise imunohistoquímica	39
4.4. Análise das áreas de imunomarcção.....	40
4.5. Bioensaio e PCR	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	48
7. FIGURAS E GRÁFICOS.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia dos tratamentos com sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (SPAF) associados, azitromicina, infusão de *Artemisia annua* e espiromicina na prevenção da transmissão vertical da toxoplasmose em *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). Fêmeas de *C. callosus* foram oralmente infectadas com 20 cistos de *Toxoplasma gondii* (cepa ME-49) no dia de detecção da rolha vaginal (primeiro dia de gestação). O tratamento com azitromicina, infusão de *A. annua* e espiromicina iniciou-se a partir do 4º dia de gestação e o tratamento com a associação de SPAF a partir do 14º dia de gestação e inóculo. Placenta e tecidos embrionários foram coletados para análises morfológica, imuno-histoquímica, bioensaio e reação de PCR do 15º ao 20º dia de gestação/inóculo. Não foram vistas alterações morfológicas nos tecidos placentários e fetais (fígado) de fêmeas tratadas com SPAF, azitromicina e espiromicina mas observou-se a presença de embriões atrofiados em animais submetidos ao tratamento com infusão de *A. annua*. Após os tratamentos, parasitos foram visibilizados em tecidos placentários e fetais (fígado) dos animais tratados com SPAF, infusão de *A. annua* e espiromicina, porém a quantidade de imunomarcações do parasito foi significativamente menor nesses animais quando comparados aos não tratados. Parasitos foram também observados nos tecidos placentários dos animais tratados com azitromicina, porém ausentes nos respectivos embriões e os resultados de bioensaio e PCR confirmaram os dados da imunohistoquímica. Adicionalmente observou-se imunomarcações para bradizoítas em tecidos placentários e fetais de animais tratados com SPAF. Em conclusão, o tratamento com azitromicina mostrou-se mais efetivo na inibição da transmissão vertical da toxoplasmose em *Calomys callosus*.

Palavras-chave: *Calomys callosus*, toxoplasmose congênita, tratamentos.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the efficiency of the treatment with combination of drugs (sulphadiazine, pyrimethamine, and folinic acid- SPFA), azithromycin, *Artemisia annua* infusion and spiramycin on the prevention vertical transmission of toxoplasmosis in *Calomys callosus*. Female *C. callosus* were perorally infected with 20 cysts of *Toxoplasma gondii* ME-49 strain at the day that a vaginal plug was observed (1st day of pregnancy -dop). Treatment with azithromycin, *A. annua* infusion and spiramycin started at the 4th dop, while the treatment with drug association started at the 14th dop. Placenta and embryonic tissues were collected for morphological and immunohistochemical analyses, bioassay and PCR from the 15th to 20th dop. No morphological changes were seen in the placenta and embryonic tissues from females treated with SPFA or azithromycin or spiramycin, but embryo atrophy was observed in animals submitted to *A. annua* infusion treatment. After treatment, parasites were observed in the placenta and fetal (brain and liver) tissues of the animals that were treated with SPFA, *A. annua* infusion and spiramycin but the number of parasites was lower than in non-treated animals. Parasites were also observed in the placenta of the animals treated with azithromycin, but not in their embryos. Bioassay and PCR results confirmed the immunohistochemical data. In addition bradyzoite immunostaining was observed in placental and fetal tissues of the animals treated with SPFA. In conclusion, the treatment with azithromycin has shown to be more effective to inhibit the vertical transmission of toxoplasmosis in *C. callosus*.

Keywords: *Calomys callosus*, Congenital toxoplasmosis, Treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Taxonômicos e epidemiológicos de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório (NICOLE; MANCEAUX, 1908) pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa e família Sarcocystidae (REY, 2001), tem potencial para infectar diferentes espécies de mamíferos e aves (DUBEY; THULLIEZ, 1993; LAVINE; ARRIZABALAGA, 2007). *T. gondii* foi descrito em coelhos no Instituto Biológico de São Paulo (SPLENDORE, 1908) e no Instituto Pauster de Tunis, em um roedor do norte da África, o *Ctenodactylus gondi*, que originou o nome da espécie (PFEFFERKORN, 1990).

Toxoplasmose, infecção causada pelo protozoário *T. gondii*, constitui uma das zoonoses mais difundidas no mundo, havendo maior incidência em locais quentes, áreas tropicais de baixas latitudes e de clima seco ou regiões montanhosas. Aproximadamente 25% da população humana global encontra-se infectada pelo parasito (FERREIRA et al., 2004; PETERSEN, 2007; ELSHEIKHA, 2008).

Existem diferenças consideráveis nos níveis de prevalência mundiais da toxoplasmose devido à alguns fatores como: população de gatos existente em determinada região, condições climáticas, hábitos higiênicos e culturais (DEGERLI et al., 2003; MONTAYA; LIESENFELD, 2004; BOYER et al., 2005), condições sócio-econômicas (PETERSEN, 2007) e fatores genéticos do hospedeiro (PEYRON et al., 2003; ELSHEIKHA, 2008). A elevada prevalência na França e Itália é atribuída ao consumo excessivo de carne crua ou mal cozida e na América Central, assim como em outros países em desenvolvimento, a alta prevalência da infecção deve-se principalmente às condições socio-econômicas e ao clima propício à sobrevivência de oocistos do parasito (ELSHEIKHA, 2008). Nos Estados Unidos estima-se que 16 a 60% das pessoas são infectadas, nas Américas Central e do Sul e no continente europeu a infecção é estimada em torno de 50 a 80% (JONES et al., 2001; DUBEY, 2004). No Brasil, as pesquisas revelam que 40 a 80% da população é positiva para *T. gondii* (KAWAZOE, 2002; ELSHEIKHA, 2008). Na África, em locais como a República Democrática de São Tomé e Príncipe, a taxa de infecção é de 75,2%. Na Turquia esse

índice é de 30,1%, no Reino Unido de 9,1% e no México, a prevalência é de 6,1 % (ELSHEIKHA, 2008).

A toxoplasmose geralmente é assintomática. Entretanto, podem ocorrer algumas manifestações características de fase aguda da infecção, como febre, mialgia, astenia, cefaléia e linfadenopatia; apesar de raras é possível a ocorrência de encefalite, hepatite e pneumonia (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; ELSHEIKHA, 2008). No entanto, esta doença é grave em pacientes imunocomprometidos onde infecções assintomáticas em estágio crônico assumem caráter agudo bem como nos casos de infecção congênita (REY, 2001; DUMÈTRE et al., 2008).

A forma congênita da toxoplasmose se dá pela transmissão vertical de taquizoítas de *T. gondii* através da placenta, podendo ser fatal (CARRUTHERS, 2002; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; ELSHEIKHA, 2008). Normalmente, essa transmissão ocorre quando uma mulher grávida soronegativa é acometida por infecção toxoplásmica primária (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; RORMAM et al., 2006). Existe também a possibilidade da transmissão vertical caso a grávida cronicamente infectada apresente algum quadro de imunodeficiência (BEAZLEY; EGERMAN, 1998; REMINGTON et al., 2001). Em fetos humanos, a toxoplasmose está associada a defeitos congênitos graves quando a infecção primária ocorre no primeiro trimestre de gestação (REMINGTON et al., 2001; DUBEY et al., 2008).

O risco de haver infecção fetal, quando a primoinfecção materna ocorre no período pré-concepção, é de apenas 1%. Quando a infecção é adquirida no primeiro e segundo trimestres de gestação, a probabilidade de transmissão da doença para o feto é de 10 a 25%, enquanto que no terceiro trimestre gestacional é cerca de 60 a 90% (JONES et al., 2003; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A incidência mundial da toxoplasmose congênita em humanos é de 1 a 6 para cada 1000 nascimentos (FREYRE et al., 2006). Segundo Remington e colaboradores (2001), a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em mulheres grávidas é de 45% na África Central, 51% na Argentina, 54,8% na Austrália, 63% no Chile e 78% na Bélgica. Elsheikha (2008) mostra que na Turquia a soroprevalência em gestantes é de 30,1%, na Índia Ocidental, 57% e na Alemanha, 63,2%.

Uma pesquisa realizada na cidade de Uberlândia-MG, com 805 mães atendidas em hospitais público e privado demonstrou soroprevalência de 51%, enquanto a incidência de toxoplasmose congênita foi de 4,9 a cada 1000 nascidos (SILVA-SEGUNDO, 2002) demonstrando a importância de um programa de triagem para toxoplasmose no período gestacional (SILVA-SEGUNDO, 2002; ELSHEIKHA, 2008; ABDALLAH et al., 2009).

A utilização de modelos experimentais permite o melhor conhecimento da participação funcional de fatores celulares e humorais na toxoplasmose (SIMS et al., 1988; ROBERTS; ALEXANDER, 1992). Roedores são os animais mais estudados como modelos para toxoplasmose (FERRO et al., 1999; PEREIRA et al., 1999; FERRO et al., 2002; FERREIRA et al., 2004; JOHANNESSEN et al., 2005).

1.2. Aspectos Morfobiológicos e ultraestruturais de *T. gondii*

T. gondii possui forma arqueada, com extremidade anterior afilada e posterior arredondada. Há presença de um núcleo, de organelas típicas de células eucariontes e de uma película externa que consiste de três membranas: a membrana plasmática, e mais duas membranas justapostas que formam o complexo da membrana interna. Na região anterior do parasito situa-se o aparelho apical, constituído de uma prega circular da membrana plasmática, delimitando uma depressão circular central. Sob esta depressão situa-se uma organela na forma de um cone oco: o conóide. O conóide é constituído por três anéis de microtúbulos, dois microtúbulos justapostos situam-se na região anterior propriamente dita e o outro situa-se mais posteriormente. Do anel posterior partem 22 microtúbulos que se dispõem de maneira espiral sob o complexo da membrana interna e se estendem para a região posterior do parasito. No interior do conóide situam-se as roptrias e micronemas (LERICHE; DUBREMETZ, 1990; DUBEY et al., 1998; HSU et al., 2006). A secreção de proteínas induzida por essas organelas está intimamente associada com a invasão de *T. gondii* à célula hospedeira (CARRUTHERS, 2006).

Micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas. Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfície

da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; NEVES, 2005). Onze proteínas de micronemas já foram descritas (MIC1 a MIC11). MIC-1, MIC-4 e MIC-6 possuem propriedade de adesão celular. Já a proteína MIC-2 está presente em todos os estágios invasivos do parasito e atua no reconhecimento da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004). O padrão de secreção de micronemas é controlado por transdução de sinal que ativa vias dependentes de cálcio e culmina na liberação do conteúdo destas (CARRUTHERS et al., 1999; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

As roptrias, em número de 4 a 10 unidades, são encontradas na região anterior do parasito e são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas (LYCKE et al., 1975; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Já foram descritas vinte e nove proteínas de roptrias (ROP1 a ROP29), elas estão associadas à internalização do parasito à célula hospedeira. Seu conteúdo protéico é liberado durante a invasão propriamente dita do parasito e na formação do vacúolo parasitóforo (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Isso é feito através da liberação de enzimas proteolíticas que atuam na digestão de proteínas da membrana celular do hospedeiro (KIM; WEISS, 2004). Além disso, as roptrias liberam seu conteúdo protéico no citoplasma da célula hospedeira e atuam na formação do vacúolo parasitóforo ficando associadas a ele garantindo a natureza não fusogênica do vacúolo, além de atuarem no recrutamento de mitocôndrias (CARRUTHERS, 2002; SINAI, 2008). A primeira proteína liberada pelas roptrias a ser identificada foi a ROP-2, que é uma proteína transmembrânica do vacúolo parasitóforo e fica exposta no citoplasma da célula hospedeira. A ROP-2 tem participação na associação de mitocôndrias da célula hospedeira ao vacúolo parasitóforo (HAJJ et al., 2006). Além disso, as roptrias estão associadas com a virulência de *T. gondii*. Recentemente demonstrou-se que a ROP18 é a proteína determinante nas cepas de alta virulência (BRADLEY; SIBLEY, 2007).

Além das roptrias e micronemas há no citoplasma destes parasitos estruturas envoltas por membranas de conteúdo elétron-denso. Tais estruturas denominam-se grânulos densos e contém uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares (GRA1 a GRA10). Uma das funções destes grânulos é a liberação de

glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, possibilitando ao parasito evadir da resposta imune do hospedeiro (CORTEZ et al., 2005; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

O processo de invasão celular de *T. gondii* é rápido, levando cerca de 15 a 20 segundos, entretanto a ação sinérgica de um conjunto de fatores é fundamental para que esse processo se complete. O citoesqueleto do parasito é fundamental para a motilidade e polarização do mesmo na célula hospedeira. Stokkermans e colaboradores (1996) demonstraram que quando os microtúbulos subpeliculares são rompidos, a forma e a polaridade apical do parasito são perdidas. O reconhecimento parasito-célula consiste no contato inicial do parasito à célula hospedeira por meio de receptores de superfície, e no contato apical onde serão liberadas as proteínas micronemais. Após o reconhecimento o parasito se adere à membrana plasmática da célula e libera o conteúdo das roptrias que será seguido pela penetração ativa do mesmo por meio de movimentos de rotação, extrusão e retração do complexo apical (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

No interior da célula hospedeira ocorre a liberação do conteúdo dos grânulos densos. A secreção destes grânulos é capaz de entre outras ações, impedir a fusão de lisossomos ao vacúolo parasitóforo, garantindo a permanência do parasito no organismo hospedeiro (CARRUTHERS, 2002; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

1.3. Formas infectantes

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

Taquizoíta é a forma de proliferação rápida do parasito. Possui forma arqueada ou em crescente, medem aproximadamente 6 µm de comprimento por 2 µm de largura. O polo anterior é mais afilado e compreende o complexo apical composto por roptrias, micronemas, conóide e anel polar. Os taquizoítas são vulneráveis aos fatores de defesa do hospedeiro produzidos pelo sistema imunológico e são estudados como alvos preferenciais para a escolha, ação e

desenvolvimento de medicamentos (GONÇALVES; YAMAMOTO, 1997; KIM; WEISS, 2004; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Taquizoítas são típicos da fase aguda da infecção, não possuem predileção por células ou órgãos específicos. São capazes de infectar células fagocíticas ou não através de um processo que requer energia. Eritrócitos podem ser infectados, no entanto, nestes o desenvolvimento do parasito não ocorre. Após a invasão na célula hospedeira, os taquizoítas se multiplicam dentro dos vacúolos parasitóforos a cada 4 horas aproximadamente, formando rosetas. Com a ruptura celular pelo intenso parasitismo, as formas invadem outras células ou são fagocitadas (REMINGTON et al., 2001).

O termo (*bradys*= lento em grego) foi empregado por Frenkel (1973) para descrever o organismo que se multiplica lentamente no interior de uma célula hospedeira. Alguns taquizoítas, ao penetrarem nas células hospedeiras, proliferam lentamente desenvolvendo um metabolismo mais lento, formando o cisto tecidual contendo bradizoítas que morfologicamente diferem pouco dos taquizoítas. Estes cistos podem atingir 300 μm com até 3000 bradizoítas no seu interior. Os cistos teciduais são freqüentemente encontrados no sistema nervoso central, músculo cardíaco e esquelético, olhos e fígado, podendo persistir no hospedeiro sem causar nenhum dano, representando reservatório da infecção. A ruptura de elevado número de cistos é considerada a expressão de reativação da infecção com subsequente liberação dos bradizoítas e sua diferenciação para taquizoítas, que proliferarão na vigência de imunossupressão (REMINGTON et al., 2001).

Oocisto é a forma de resistência encontrada no ambiente, a qual contém esporozoítas, podendo contaminar água, solo e alimentos (AMENDOEIRA, 1995). Oocistos contendo esporozoítas representam um estágio parasitário altamente infeccioso. Estes são excretados nas fezes dos felinos após a reprodução sexual no intestino desses animais (KASPER; BOOTHROYD, 1993) e liberados ainda imaturos (bilhões diariamente) junto com as fezes. Os oocistos não esporulados são ovais e depois de esporulados ou maduros são elípticos e medem de 11 a 14 μm . Dependendo da temperatura e oxigenação, a esporulação ocorre em dois ou três dias, podendo permanecer viáveis por meses ou anos, conforme condições de temperatura

(-20°C a 37,5°C) e umidade (REMYINGTON et al., 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

1.4. Ciclo biológico

O ciclo biológico de *T. gondii* se processa em duas fases distintas: assexuada e sexuada. Os felídeos dos gêneros *Felis* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos porque apresentam a etapa assexuada (merogonia) e uma sexuada (gamogonia) do ciclo. Já os outros animais, como mamíferos e aves, possuem apenas o ciclo assexuado do parasito e são considerados hospedeiros intermediários de *T. gondii* (DUBEY et al., 1998; NEVES, 2005).

Os felídeos podem se contaminar ao ingerir cistos teciduais contendo bradizoítas, oocistos maduros ou taquizoítas, iniciando a fase enteroepitelial do ciclo no epitélio do intestino delgado desses animais (NEVES, 2005). Esses são os únicos animais capazes de eliminar oocisto de *T. gondii* nas fezes. Essa eliminação ocorre de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos teciduais, 18 dias após ingestão de oocistos e 13 dias após ingestão de taquizoítas. Quando há ingestão de taquizoítas ou oocistos cerca de 30% dos gatos passam a eliminar oocistos, no entanto, aproximadamente 100% dos gatos passam a eliminar oocistos após ingerirem cistos teciduais (DUBEY et al., 1998; ELSHEIKA, 2008).

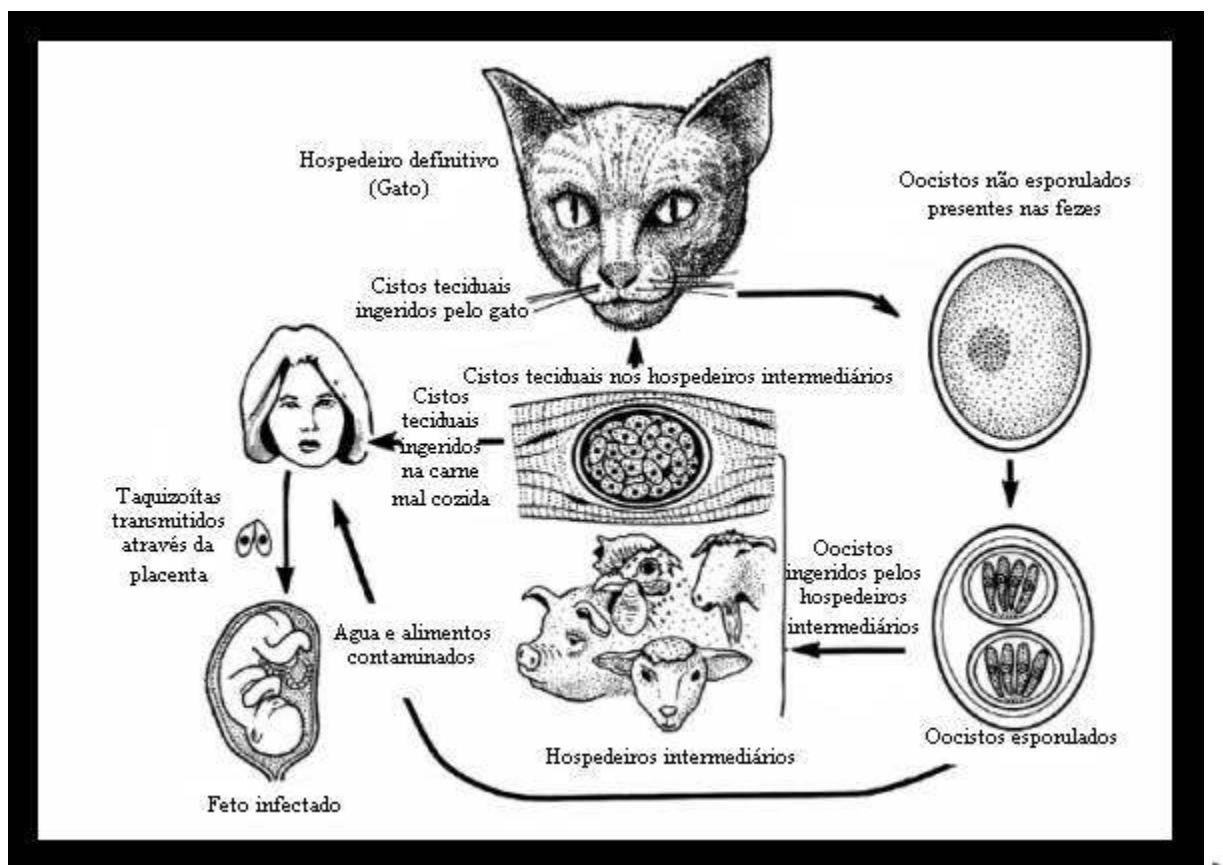
O ciclo induzido pela ingestão de bradizoítas é o melhor conhecido. Após a ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, inicia-se a fase assexuada do ciclo. A parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago desses animais, promovendo a liberação de bradizoítas que penetram nas células do intestino. Nas células epiteliais do intestino, há o início da etapa assexuada do ciclo, na qual os parasitos começam a se multiplicar através do processo de endodiogenia (merogonia). Há então a formação de merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo, esse conjunto recebe o nome de esquizonte maduro (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004).

A etapa sexuada do ciclo se inicia quando ocorre o rompimento da célula infectada com consequente liberação dos merozoítos. Estes penetram em outras

células epiteliais e se transformam em formas sexuadas masculinas e femininas, que após a maturação formam os gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis (microgametas). Os microgametas saem das células e fecundam o macrogameta, presente em outras células. Depois da fertilização há formação de uma parede externa envolvendo o zigoto, dando origem ao oocisto imaturo que é liberado para o meio junto com as fezes dos felídeos (DUBEY, 1998; NEVES, 2005). No ambiente com condições ideais de temperatura e umidade tornam-se esporulados, infectantes (NEVES, 2005).

Os hospedeiros intermediários, como o homem, por exemplo, adquirem a infecção pela ingestão de oocistos presentes em água e alimentos contaminados, pela ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas, pela ingestão de taquizoítas que podem estar presentes em líquidos biológicos (saliva, leite, esperma); ou ainda, transplantes de órgãos e infecções transplacentárias (FERREIRA; ÁVILA, 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Ocorrendo o contato com o parasito, este sofre intensa multiplicação e penetra em várias células do hospedeiro, local onde o parasito forma o vacúolo parasitóforo e se multiplica por endodiogenia formando novos taquizoítas. Estes rompem as células parasitadas e infectam outras células (NEVES, 2005).

O ciclo completo de *T. gondii* está representado no esquema que se segue, modificado de Dubey et al. (1998).



Luís Oliveira

1.5. Linhagens Clonais de *T. gondii*

O genoma de *T. gondii* é haplóide, exceto durante a fase de reprodução sexuada que ocorre no interior das células intestinais de seus hospedeiros definitivos, contendo cerca de 8×10^7 pares de nucleotídeos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A maioria dos isolados identificados na Europa e América do Norte pertence a um dos três genótipos, Tipo I, II ou III. A diferença genética entre essas linhagens clonais é de aproximadamente 1% de seus genes. Análises genéticas detalhadas evidenciam que a variação gênica dentro de cada genótipo de *T. gondii* é extremamente rara (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Entretanto, há um aumento no número de cepas descobertas que não pertencem a estes três genótipos. Essas cepas são denominadas recombinantes ou exóticas pelo fato de seus genótipos serem diferentes ou por representar uma mistura dos três genótipos existentes. Estudos demonstraram abundância de cepas recombinantes em pacientes com retinocoroidite no Brasil (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; PETERSEN, 2007) apresentando correlação entre o genótipo de *T. gondii* e as manifestações da doença em humanos (SAEIJ et al., 2005).

Diferenças nos padrões de virulência e epidemiologia são observadas nas três linhagens clonais. Linhagens do tipo I, como a RH, CAST e VEL são altamente virulentas para camundongos, linhagens do tipo II, como a ME49 são menos virulentas, podendo causar mortalidade dependendo da carga parasitária e da resposta imune do hospedeiro. As linhagens do tipo III, como a VEG, são consideradas moderadamente virulentas. Em geral, as linhagens do tipo II são cistogênicas, enquanto as linhagens tipo I possuem capacidade reduzida de formar cistos em cultura de células ou em animais infectados (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; KIM; WEISS, 2004; SAEIJ et al., 2005). Em humanos, linhagens clonais do tipo II são mais comumente isoladas de infecções crônicas e congênitas na Europa, enquanto que linhagens isoladas de pacientes com toxoplasmose ocular na América do Sul são predominantemente do tipo I e linhagens do tipo III são mais comumente isoladas de animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; PETERSEN, 2007).

A cepa RH foi isolada em 1939 de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmica (HOWE; SIBLEY, 1994). Esta cepa, em camundongos, é letal mesmo com dose mínima de taquizoítas (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Ratos Sprague-Dawley infectados com 1×10^6 taquizoítas desta cepa permanecem clinicamente normais, enquanto camundongos Swiss inoculados com apenas um taquizoíta podem morrer de toxoplasmose aguda (FRENKEL, 1973; DUBEY et al., 1998).

A cepa ME-49 foi originalmente isolada da musculatura de carneiro em 1965. É cistogênica e de baixa virulência (SUZUKI et al., 1988). Em camundongos BALB/c a cepa ME-49 produz cistos que são, particularmente, evidentes no cérebro. O aparecimento de cistos é comum na fase crônica da infecção que persiste por toda a vida destes animais. Por outro lado, camundongos C57BL/6 infectados com a mesma cepa desenvolvem uma meningoencefalite progressiva com elevada taxa de mortalidade após doze semanas de infecção (GAZZINELLI et al.; 1993). Pereira et al. (1999) mostraram que *Calomys callosus*, roedores da família Cricetidae, são resistentes a esta cepa permitindo estudos sobre a transmissão vertical da toxoplasmose nestes animais.

1.6. Patogenia, resposta imune e diagnóstico da toxoplasmose

A toxoplasmose é considerada um problema de saúde pública, pois desenvolve quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos e em casos de infecção congênita. Excluindo tais ocasiões, a doença geralmente cursa de forma assintomática ou benigna (JEFFREY et al., 2005; DUMÉTRE et al., 2008).

O curso da doença se dá em dois estágios: fase aguda e fase crônica. Na fase aguda, taquizoítas se multiplicam rapidamente e invadem novas células. As manifestações clínicas desta fase variam entre febre, dor de garganta, linfadenopatia, mialgia, astenia, cefaléia e coriorretinite. Já na fase crônica, devido à ação da imunidade adaptativa, a resposta imunológica do hospedeiro ao parasito torna-se mais eficaz. O indivíduo pode não apresentar sintomas clínicos. Em pacientes imunocomprometidos (HIV positivos, pacientes em tratamento quimioterápico, indivíduos transplantados ou indivíduos com doenças auto-imunes) a manifestação da doença quase sempre ocorre como resultado da reativação de cistos pré-existentes. Neste contexto, os bradizoítas voltam ao estágio de taquizoítas, podendo levar o paciente a óbito (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; MENZIES et al., 2008).

A transmissão vertical da toxoplasmose ocorre em 20 a 50% dos casos de primo infecção materna (JONES et al., 2001; ELSHEIKA, 2008). Crianças infectadas podem apresentar microcefalia, hidrocefalia, calcificação intracranial e coriorretinite, além de retardamento mental e psicomotor (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; JOHANNESSEN et al., 2005; ELSHEIKA, 2008).

Estudos experimentais em diferentes espécies de roedores revelaram que os mecanismos de transmissão e intensidade das lesões resultantes de toxoplasmose congênita dependem do tempo de gestação do animal infectado, do sítio de infecção e da cepa do parasito (ZENER et al., 1993; FERRO et al., 1999; FERRO et al., 2002; GRUJIC et al., 2005).

A principal resposta protetora contra *T. gondii* dá-se através da resposta imune celular. Após a interação com antígenos parasitários, macrófagos atuam como células efetoras e apresentadoras de antígenos. Como efetoras, macrófagos inibem a replicação parasitária pela produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e

do nitrogênio (RNI), tais como óxido nítrico (NO), que bloqueiam o metabolismo do parasito, impedindo assim sua sobrevivência. Macrófagos ativados secretam altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α), que possui atividades microbicidas (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; MENZIES et al., 2008; MILLER et al., 2009). Como células apresentadoras de antígenos produzem interleucina-12 (IL-12) em resposta a alguns antígenos liberados por taquizoítas, essa interleucina estimula células NK (*Natural Killers*) a produzir e secretar altos níveis de Interferon- γ (IFN- γ), o qual induz a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ . Elevados níveis de IFN- γ estimulam macrófagos e células dendríticas a liberarem mais IL-12, amplificando assim a resposta imune. IL-12 estimula também a produção IFN- γ por linfócitos T CD8⁺. Além disso, essas células apresentam atividade citotóxica, o que leva à lise de células infectadas com conseqüente liberação de taquizoítas. Esses por sua vez, ficam acessíveis a outros mecanismos da resposta imune, tais como anticorpos, sistema complemento, macrófagos ativados e células NK (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005; MENZIES et al., 2008; MILLER et al., 2009).

A resposta imune pró-inflamatória, caracterizada por um perfil Th1, é efetiva no controle de taquizoítas, entretanto, ela pode ser danosa ao hospedeiro, devido principalmente à alta produção de IFN- γ que lesa os tecidos infectados. Desse modo, é necessária a ação de mecanismos imunomoduladores para o estabelecimento de um balanço entre um perfil de resposta Th1 e Th2. Esse balanço é mediado por IL-10, que é produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária. IL-10 apresenta efeitos inibitórios sobre a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T, sobre macrófagos ativados, sobre a diferenciação de clones Th1 de células T e sobre a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. Estudos demonstram que camundongos deficientes em IL-10 não conseguem controlar a infecção e morrem durante a fase aguda, provavelmente devido à acentuada resposta inflamatória que ocorre principalmente no fígado e no intestino delgado, em virtude da produção descontrolada de TNF- α e IFN- γ (GAZZINELLI et al., 1996; MILLER et al., 2009).

As células NK são importantes na defesa contra *T. gondii*, uma vez que promovem a lise do mesmo (ABOUT-BACAR, et al., 2004). Combe (2005), utilizando

camundongos C57BL/6 demonstrou que na ausência de células TCD4⁺, há maior produção de células NK que promovem a indução de células TCD8⁺ em resposta ao parasito.

Os mastócitos também exercem proteção contra *T. Goldie* pois liberam histaminas, proteases, ácido aracdônico e várias citocinas como IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16 e fator de necrose tumoral (TNF- α). Estes mediadores são sintetizadas ou algumas já estão estocadas para serem liberadas imediatamente ou secretadas pelos mastócitos cerca de uma hora após o contato com o antígeno (FERREIRA et al., 2004).

Durante a gestação as funções fisiológicas maternas também são bastante alteradas. Muitos hormônios, mais notavelmente estrógenos e progesterona, estão amplamente aumentados; esta condição gera alterações no balanço de citocinas de perfil Th1/Th2 com tendência a um perfil Th2 (ROBERTS et al., 2001; MENZIES et al., 2008; MILLER et al., 2009).

Em murinos, citocinas que caracterizam o perfil Th2 estão associadas ao sucesso da implantação embrionária e à supressão de respostas inflamatórias locais (ABOUT-BACAR et al., 2004; MILLER et al., 2009).

A influência hormonal no sistema imunológico, para evitar a rejeição do feto, pode potencializar a infecção parasitária (ROBERTS et al., 2001). Progesterona favorece um padrão de produção de citocinas Th2; a relaxina produzida pelo corpo lúteo favorece o perfil Th1 e o β estradiol que em altas concentrações favorece a produção de IL-10 e, em baixas concentrações, a de IFN- γ (ENTRICAN, 2002; MILLER et al., 2009).

Em camundongos, a ativação de macrófagos por IFN- γ , em presença de co-estimuladores, como LPS (lipopolissacarídeos) ou TNF- α , é necessária para induzir a atividade citotóxica de macrófagos contra *T. gondii* (SIBLEY et al., 1993). O papel funcional de IFN- γ na interface materno-fetal é intrigante. Quando camundongos infectados por *T. gondii* recebem IFN- γ se observa uma melhora no quadro da infecção sistêmica (McCABE et al., 1984; SUZUKI et al., 1988); entretanto, ocorre aumento na infecção placentária e fetal (ABOUT-BACAR et al., 2004). Adicionalmente, linhagem de células trofoblásticas humana (BeWo) é

incapaz de controlar a infecção por *T. gondii*, mesmo quando tratada com IFN- γ (OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008).

A pressão da resposta imune do hospedeiro exercida sobre o parasito promove a formação de cistos teciduais. O aparecimento de bradizoítas marca o início da fase crônica da infecção quando a replicação do parasito diminui drasticamente. Cistos teciduais são “virtualmente invisíveis” ao hospedeiro desde que exista pequena ou nenhuma evidência de inflamação ou células imunes infiltradas. A reativação da latência da infecção pode ocorrer em uma variedade de tecidos, inclusive no sistema nervoso central onde a replicação do parasito pode conduzir à encefalite toxoplásmica (CARRUTHERS, 2002), o que torna o diagnóstico precoce de fundamental importância na maioria dos casos de toxoplasmose.

Anticorpos IgM e IgG são essenciais no diagnóstico da toxoplasmose (GROSS et al., 2004; PETERSEN, 2007). Em humanos infectados, a resposta humoral pode ser detectada precocemente. O diagnóstico da toxoplasmose é feito, principalmente, por testes sorológicos como por exemplo o teste ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) que é uma reação imunoenzimática quantificada através da reação enzima-substrato. Estes são realizados tendo como objetivo a detecção de anticorpos IgG e IgM, que são importantes marcadores sorológicos para diagnosticar a fase da doença (GROSS et al., 2004; PETERSEN, 2007). Anticorpos IgG geralmente surgem duas semanas após a infecção, com picos entre a 6^a e 8^a semanas (CAMARGO et al., 1991; MONTOYA; LIESENFELD, 2004) persistindo no corpo indefinidamente como maturação da resposta imunológica, onde este anticorpo passa a apresentar alta avidéz (ROITT et al., 2003; SUKTHANA, 2006; ABDALLAH et al., 2009).

O diagnóstico durante o período gestacional é realizado pela detecção de IgM específico materno ou por soroconversão durante a gestação. Com realização de técnicas de maior sensibilidade para detecção de IgM e/ou IgA, tais como ELISA de captura e ELISA-avidéz, cuja sensibilidade atinge até 95% onde observa-se a persistência de IgM por períodos maiores que um ano. Na presença de IgM específica na primeira triagem da gestante, acompanhada da presença de IgG, tem-se a dificuldade na determinação da época provável da infecção materna e se o tratamento é ou não recomendável. Recomenda-se a realização do perfil sorológico

para toxoplasmose no início da gestação com a repetição dos exames durante todo o período gestacional (ASHUBURN et al., 1998; BOYER et al., 2005, PETERSEN, 2007; ELSHEIKHA, 2008).

Técnicas utilizadas para inferência no diagnóstico da infecção fetal, devem ser aquelas que detectam quantidades mínimas de IgM e IgA e que não sofram influência da presença de IgG materna decorrente da passagem transplacentária (LYNFIELD et al., 1999). Outras técnicas como “*Western-Blot*”, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em líquido amniótico para detecção de DNA do parasito são padrão ouro para o diagnóstico da infecção fetal (ANDRADE et al., 2001; ABDALLAH et al., 2009).

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 sequelas tardias (RORMAN et al., 2006; ABDALLAH et al., 2009).

1.7. Terapêutica da Toxoplasmose

Uma droga ideal para o tratamento da infecção por *T. gondii* deve apresentar penetração efetiva, propriedades parasiticidas contra os diferentes estágios do parasito, distribuição nos sítios principais de infecção fetal e total isenção de toxicidade fetal e de efeitos teratogênicos. No entanto, nenhuma droga atualmente utilizada no tratamento humano da toxoplasmose apresenta todos esses critérios (DEROUIN et al., 2000; ELSHEIKHA, 2008).

As drogas utilizadas no controle da toxoplasmose podem ser agrupadas nas seguintes categorias:

Antagonistas de Folato: Essas drogas inibem a síntese de enzimas que participam da via da síntese de folato, impedindo a duplicação do DNA celular em estágio agudo da infecção. Nesse grupo estão incluídas as drogas pirimetamina, trimetopim e sulfadiazina, que possuem efeito sinérgico. O uso combinado de pirimetamina e sulfadiazina é aprovado como tratamento de escolha para a toxoplasmose desde 1950. Seu uso combinado é oitenta vezes mais efetivo que a utilização das drogas separadamente. Entretanto, a sulfadiazina não é bem tolerada

pelo organismo, apresentando efeitos adversos, principalmente supressão de atividade da medula óssea (PETERSEN, 2007). Além de ser necessária a concomitante administração de ácido fólico, principalmente em pacientes grávidas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; MARTINS-DUARTE et al., 2006).

Macrolídeos: apresentam efeito tóxico ao parasito através da ligação a açúcares e inibem a síntese protéica do parasito. Os macrolídeos mais comuns utilizados contra a toxoplasmose são espiramicina, clindamicina e a azitromicina que está em fase de estudo (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). A espiramicina possui atividade toxoplásmica intracelular e capacidade de atravessar a barreira placentária. Entretanto não é indicada para o tratamento da toxoplasmose ocular, sendo a clindamicina o tratamento de escolha para esse caso. A clindamicina é utilizada combinada à pirimetamina em pacientes que são sensíveis a sulfadiazina (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ABDALLAH et al., 2009).

Hidroxi-naftoquinonas: são drogas muito usadas no controle de parasitos do gênero *Plasmodium* e os efeitos tóxicos ao parasito são devido à inibição do citocromo bc1 que é um receptor de elétrons de diversas vias metabólicas e doa esses elétrons para o citocromo c (inibem a cadeia respiratória do parasito). A principal droga pertencente a essa classe é a Atovaquone, que é uma hidroxynaphthoquinone. Estudos em camundongos indicam que essa droga pode ter efeito sobre cistos teciduais de *Toxoplasma* (FERREIRA et al., 2006; PETERSEN, 2007), representando assim, um alvo potencial em estudos que visam a redução da recorrência da doença. Contudo não podem ser utilizados em mulheres grávidas devido aos potentes efeitos nocivos ao embrião. Dessa forma é indicada no tratamento de pacientes imunocomprometidos cronicamente infectados (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Fluoroquinolonas: impedem a proliferação do parasito devido à inibição de enzimas envolvidas na replicação do DNA. Gatifloxacina e travafloxacina são duas fluoroquinolonas que mostram efeitos no tratamento experimental contra *T. gondii* (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Corticosteróides: são drogas que inibem a resposta imune do hospedeiro, podendo assim diminuir uma alta resposta inflamatória gerada pelo parasito, porém, o uso de corticosteróides deve ser utilizado com cautela (KATZUNG, 2006).

1.7.1. Uso de medicamentos no período gestacional

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

Os fatores críticos que influenciam a transferência placentária das drogas e os 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).

Em infecção primária de gestantes, o tratamento de escolha é iniciado com a administração de espiramicina e posteriormente a associação de pirimetamina e sulfadiazina com administração concomitante de ácido folínico (PETERSEN, 2007; ABDALLAH et al., 2009).

O quadro a seguir demonstra indicações de tratamento para a infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes em diferentes estágios da infecção, bem como indicação de tratamento para toxoplasmose congênita (REMINGTON et al., 2001).

Quadro 1. Guia para o tratamento da infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes e em infecção congênita de acordo com Remington e colaboradores, 2001.

Manifestação da Infecção	Medicação	Dosagem	Duração da Terapia
<i>Toxoplasmose materna aguda</i>	Espiramicina	1 g/kg de peso corporal a cada 8h antes das refeições	Até infecção fetal documentada ou excluída até 21 semanas, se documentada, alternando mensalmente com pirimetamina, ác. folínico e sulfadiazina
<i>Infecção fetal confirmada</i>	Pirimetamina e	50 mg/kg de peso corporal duas vezes ao dia durante 2 dias	Durante uma semana após tratamento com pirimetamina
	Sulfadiazina e	75 mg/kg por 2 dias dividido em 2 doses	
	Ácido Folínico	10-20 mg/kg de peso corporal diariamente	

A seguir, as características gerais de alguns fármacos utilizados ou em fase de estudo para o tratamento da toxoplasmose congênita:

1.7.2. Espiramicina

Caracterizam-se por apresentar um anel de lactona macrocíclico (contendo em geral 14 a 16 átomos de carbono) ao qual se ligam açúcares. Essa droga atua inibindo a síntese protéica do parasito (REMYINGTON et al., 2001; KATZUNG, 2006). Geralmente reduz a transmissão materno-fetal do parasito sendo bem tolerada com efeitos ao feto ainda não elucidados (GRUJIC et al., 2005). Este composto é freqüentemente utilizado em vários tipos de infecções sendo produzido principalmente por certas linhagens de *Streptomyces ambofaciens* na Europa e por *Streptomyces spiramyceticus* na China (LIN-ZHUAN et al., 2007); esta droga pode também ser usada no tratamento de infecções do sistema respiratório e genito-urinário bem como em criptosporidiose (SHI et al., 2004), além de possuir grande atividade contra patógenos como *Helicobacter pylori* (HUEBRA et al., 2004). Nos Estados Unidos é usada como agente subterapêutico para melhorar as taxas de

crescimento e alimentação de frangos, bem como no controle de doenças respiratórias causadas por micoplasmas (LIN et al., 2007).

Quando apenas a mãe é infectada, indica-se o tratamento com espiramicina (REMINGTON et al., 2001; KATZUNG, 2006). A espiramicina atravessa a barreira placentária sendo capaz de retardar a transmissão da doença, promovendo redução na severidade da infecção fetal (REMINGTON et al., 2001). No entanto, ainda não são elucidados os efeitos desse medicamento em fetos (GRUJIC et al., 2005; ELSHEIKHA, 2008). É utilizada em muitos países da Europa, especialmente na França assim como na Ásia e América do Sul (RORMAN et al., 2006). Por ser um antibiótico do grupo dos macrolídeos, possui espectro antibactericida comparável à eritromicina (REMINGTON et al., 2001).

Estudo realizado por Foulon e colaboradores (1999) demonstrou redução de 60% no risco total da transmissão fetal utilizando espiramicina no tratamento de mães infectadas por *T. gondii* durante a gravidez. A redução no risco de infecção congênita obtida numa série de 746 mulheres com infecção aguda na gravidez foi atribuída à introdução do tratamento com espiramicina no início da gravidez e sua continuação até o parto; Entretanto, alguns estudos não obtiveram o mesmo índice de sucesso (GRUJIC et al., 2005; LEFEVRE-PETTAZZONI et al., 2007). Similarmente à maioria das drogas anti-*T. gondii*, a espiramicina atua somente nas formas taquizoítas do parasito (GRUJIC et al., 2005) e apesar de reduzir a frequência da transmissão da doença, esse medicamento não altera a patologia da infecção fetal. Sendo assim, é necessário, a partir da décima oitava semana de gestação, iniciar o tratamento com sulfonamidas e pirimetamina (REMINGTON et al., 2001; ELSHEIKA, 2008).

1.7.3. Sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico

A sulfadiazina é um derivado das sulfonamidas que podem ser consideradas derivadas de sulfanilamidas, por substituição de um átomo de hidrogênio do grupo amino, sulfamido, ou ambos. Em sua maioria, as sulfonamidas disponíveis atualmente são derivadas da sulfanilamida contendo núcleos heterocíclicos na posição N4. Quanto às propriedades físico-químicas, as sulfonamidas apresentam-se

em forma de sólidos brancos, cristalinos, hidrossolúveis, podendo ser administradas via oral, parenteral, retal ou tópica. Uma vez absorvidas, se distribuem por todos os tecidos e líquidos do organismo podendo ser encontradas variadas concentrações destes fármacos na bile, sucos digestivos, líquido pleural. Atravessam facilmente a placenta, atingindo a circulação fetal e, em menores quantidades, o leite materno. A atividade farmacodinâmica deste medicamento se deve ao fato de serem análogos estruturais do ácido p-aminobenzóico (PABA). Através da inibição competitiva, as sulfonamidas impedem a incorporação do ácido p-aminobenzóico durante a biossíntese do ácido diidropteróico, funcionando dessa forma como antimetabólito. A aplicação clínica desse antimetabólito fundamenta-se em sua toxicidade seletiva sendo mais tóxico para o microorganismo que para o homem (SILVA, 1998).

A enzima diidrofolato-redutase (DHFR) é um alvo clássico na quimioterapia antiparasitária, bastante utilizada no combate à protozoários como *Plasmodium* sp e *T. gondii*. A pirimetamina atua inibindo ativamente a DHFR nesses animais (GOOLDMAN; GILMAN, 2001).

As enzimas DHFRs convertem o ácido diidrofólico 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 (KATZUNG, 2006).

O uso da pirimetamina freqüentemente está associado a outros fármacos principalmente no tratamento da malária, evitando assim o aparecimento de resistência. Atua como inibidor da biossíntese dos ácidos nucleicos. Entretanto, é pouco empregado na terapêutica por ser altamente tóxico, pois interage indistintamente com os processos bioquímicos tanto do parasito quanto do hospedeiro. A pirimetamina é absorvida lentamente no trato gastrointestinal, e após absorção, liga-se, em alta proporção, às proteínas plasmáticas, sendo parcialmente biotransformado em diversos metabólitos. É distribuído para vários órgãos concentrando-se sobretudo nos rins, fígado, pulmão, baço e células sanguíneas. Pode ser excretado nas fezes, urina e até no leite materno (SILVA, 1998; KATZUNG, 2006). A pirimetamina pode ser teratogênica e por isso seu uso não é recomendado durante

os primeiros meses de gravidez (BRAZ et al., 1999; DEGERLI et al., 2003). Produz efeitos adversos previsíveis de um fármaco antifolato, em particular a supressão da medula óssea, podendo ocasionar anemia megaloblástica, leucopenia e granulocitopenia (KATZUNG, 2006). Embora já existam outros medicamentos com reconhecida atividade anti-*Toxoplasma* como a clindamicina, o sulfametazol-trimetropin e a espiramicina, nenhum tem a eficácia da combinação formada por sulfadiazina e pirimetamina. Apesar de não possuírem ação contra cistos do parasito podem ser prescritos em situações específicas (BRAZ et al., 1999; JONES-BRANDO et al., 2003; SYROCOT et al., 2007).

O efeito teratogênico da pirimetamina pode ser inibido através da administração de ácido folínico em gestantes agudamente infectadas (SILVA, 1998; REMINGTON et al., 2001; KATZUNG, 2006).

O ácido fólico, também conhecido como ácido pteroil-glutâmico e folacina, é amplamente distribuído nos alimentos. Apresenta-se como um pó cristalino amarelo pouco solúvel em água, insolúvel em álcool, acetona, benzeno e éter. É facilmente absorvido pela mucosa duodenal. Após absorção, o ácido transforma-se em coenzimas ativas que se distribuem pelos diferentes órgãos, concentrando-se principalmente no fígado, convertendo-se em ácido folínico, processado através da urina e fezes. Este participa da constituição de várias enzimas que funcionam como catalisadoras monocarbônicas utilizadas nas reações de metilação (SILVA, 1998).

Em casos de infecção fetal, é indicada a combinação das drogas sulfadiazina-pirimetamina e ácido folínico (JONES-BRANDO, 2003; GRUJIC et al., 2005; JOHANNESSEN et al., 2005). O uso desta associação de drogas pode reduzir o risco de toxoplasmose congênita em até 70%, pois estes antibióticos agem sinérgica e eficientemente, cruzam a barreira placentária e previnem a progressão dos danos ao feto (GAGNE, 2001; BOYER et al., 2005).

Diante da potencial gravidade das manifestações da toxoplasmose e conseqüente defeitos congênitos, necessário se faz a busca de fármacos que visem minimizar possíveis defeitos fetais. Entretanto, igualmente preocupante são os possíveis efeitos colaterais ocasionados pelas drogas tanto para a gestante quanto para o feto, particularmente a pirimetamina pelo seu potente efeito teratogênico

(BRAZ et al., 1999; DEGERLI et al., 2003). Isso torna necessário o desenvolvimento e teste de novas drogas que visem atuar em pacientes imunocompetentes durante a primoinfecção materna.

Além das drogas preconizadas no tratamento da toxoplasmose, outros medicamentos estão sendo pesquisados para o tratamento da toxoplasmose, dentre elas, artemisinina que é um derivado da planta *Artemisia annua*, composto comumente utilizado no tratamento da malária (SARCIRON et al., 2000; DUNAY et al., 2004; FERREIRA et al., 2006; JONES-BRANDO et al., 2006) e a azitromicina que apesar de apresentar bons resultados para o tratamento da toxoplasmose em camundongos (BRAZ et al., 1999; DEGERLI et al., 2003), ainda não é utilizada em humanos.

1.7.4. *Artemisia annua* L.

Artemisia annua ou Qinghao é uma erva própria da vegetação de estepes na China, também encontrada em países como Austrália, Argentina, França, Bulgária, Hungria, Itália e USA (HEEMSKERK et al., 2006). Taxonomicamente pertence à família Asteracea, cujas plantas são utilizadas na medicina popular, como *Artemisia vulgaris* L. e *Calendula officinalis*, usadas no controle de verminoses, e *Achillea millefolium* L., usada em problemas estomacais (LANS et al., 2007).

O uso da infusão aquosa de *A. annua* para tratar febres da malária é uma prática antiga (datando aproximadamente do ano 150 A.C.), mas somente em 1972 seu principal composto ativo, artemisinina ou Qinghaosu, foi isolado e subsequentemente diversos derivados desta (OU-YANG et al., 1990).

A artemisinina é um dos principais compostos presente na infusão de folhas e flores de espécies arbustivas do gênero *Artemisia*, sendo encontrada em maior quantidade na espécie *A. annua* L. (HSU et al., 2006). Constitui-se por um lactona trioxano sesquiterpênico, possuindo ainda em sua estrutura uma endoperoxidase (C-O-O-C) que é única entre as drogas anti-maláricas e é essencial para sua atividade (AGTMAEL et al., 1999). A lactona pode ser reduzida com borohidrido de sódio

resultando na formação de dihidroartemisinina, um dos derivados de artemisinina (DHINGRA et al., 1999; KRISHNA et al., 2009).

Apesar da importância dada à artemisinina, esse composto não é o único presente em extratos de *A. annua*, sendo existentes também metabólitos secundários como sesquiterpenos, flavanóides, cumarinas, esteróides e compostos alifáticos. A combinação e ação conjunta de todos esses constituintes promove o efeito sinérgico que é responsável pelas atividades antibacterianas, antiinflamatórias e antitumorais do extrato, como já demonstram alguns estudos (BHAKUNI et al., 2001; BILIA et al., 2006; KRISHNA et al., 2009).

Tanto a artemisinina quanto seus derivados semi-sintéticos sofrem rápida absorção gastro-intestinal e são primeiramente metabolizados no fígado, sendo rapidamente hidrolisados à dihidroartemisinina e eliminados rapidamente do plasma. O mecanismo de ação da artemisinina consiste em sua conversão em radicais livres, os quais são capazes de reagir com proteínas específicas, sendo a reação catalisada por ferro (DHINGRA et al., 1999; HARTWIG et al., 2009).

Os principais efeitos adversos observados durante o uso de artemisinina são dores de cabeça, febre, dor abdominal e diarreia. A ingestão de altas doses é associada a danos neurológicos em experimentos observados com cães e gatos. Em gestantes a administração da artemisinina ainda é limitada (DHINGRA et al., 1999).

Pesquisas relacionadas à toxicidade da artemisinina e seu efeito em embriões e fetos de animais como ratos, coelhos e micos, evidenciaram a embriofetotoxicidade e anormalidades morfológicas induzidas durante estágios iniciais da gravidez, além da toxicidade materna. Além disso, há indícios de perda embrionária anterior à implantação do embrião (CLARK et al., 2004; BOARETO et al., 2008). Estudos prévios têm reportado a utilização de artemisinina e seus derivados sintéticos no controle da infecção *in vitro* por *T. gondii*. Holfels e colaboradores (1994) demonstraram diminuição do número de parasitos em células infectadas após administração de arteether, um dos derivados da planta. Sarciron e colaboradores (2000) mostraram que a utilização da combinação de artesunato e dihidroartemisinina induziu inibição do parasitismo celular *in vitro*. Em modelo

murino houve diminuição de 40% de cistos do parasito nos animais que foram tratados pela combinação das drogas.

Um estudo comparando a eficácia de quatro diferentes derivados de artemisinina em inibir a multiplicação de *T. gondii* em cultura celular, apresentou maior eficiência do artemether em relação aos demais derivados (JONES-BRANDO et al., 2006).

Oliveira (2007) avaliou os efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato de *A. annua* no controle da infecção aguda por *T. gondii*. Ficou comprovada a eficácia do tratamento com 75% de inibição do parasito com o uso direto do extrato sobre o mesmo e 30% de inibição com o uso do extrato em células infectadas pelo protozoário. No entanto, não existem dados na literatura sobre a utilização da infusão no combate à toxoplasmose congênita, sendo imprescindível a realização de estudos que busquem averiguar a possível eficácia desse tratamento para esta situação clínica, bem como efeitos adversos para o organismo materno e fetal.

1.7.5. Azitromicina

A azitromicina é um antibiótico da classe dos "azalídeos". Os membros desta classe de droga são derivados de macrolídeos. A azitromicina diferencia-se da eritromicina em dois aspectos: sua lactona é constituída por 15 membros e contém um átomo de nitrogênio, ao passo que a lactona da eritromicina possui 14 membros, não possuindo o átomo de nitrogênio. Essas diferenças são responsáveis pelas melhores características farmacológicas e microbiológicas da azitromicina: seu espectro de ação é amplo, sua difusão tecidual é mais rápida e elevada e sua meia-vida biológica é mais prolongada do que a de outros macrolídeos. Além disso, inovam na possibilidade de administração única ao dia, resistência à degradação ácida do estômago, redução dos efeitos colaterais gástricos e na ampliação das propriedades terapêuticas (KATZUNG, 2006; PETROPOULOS et al., 2009).

Após a administração oral em humanos, a azitromicina é amplamente distribuída pelo corpo. O tempo necessário para alcançar os picos de concentração

plasmática é de 2-3 horas, podendo ser assim administrada a qualquer hora do dia, inclusive com as refeições (KATZUNG, 2006).

A estrutura da azitromicina confere maior estabilidade em meio ácido, melhor características farmacocinéticas e atividade contra microorganismos Gram-negativos enquanto retém também a eficácia da eritromicina contra microorganismos Gram-positivos. Além disso, é um antibiótico macrolídeo de amplo-espectro que atua pela ligação reversível à subunidade 50S do ribossomo bacteriano e por inibir a síntese de proteínas RNA-dependentes (RETSEMA, 2001; TORKILDSEN et al., 2008; PETROPOULOS et al., 2009).

Duas regiões do ribossomo são críticas para a síntese de proteínas, o centro decodificador na subunidade 30S que garante que apenas os tRNA portadores de anticódons que se pareiam com o códon (chamados de RNA *cognatos*) sejam aceitos no sítio A e o centro de peptidil transferase na subunidade 50S onde os tRNA cognatos se associam para a formação da ligação peptídica (PETROPOULOS et al., 2009).

Um alvo inibitório adicional da ação da azitromicina relaciona-se à montagem da subunidade 50S do ribossomo, a azitromicina assim como a eritromicina, impede a seqüência de montagem normal, culminando no acúmulo de partículas incompletas de ribossomos que subsequentemente são degradados (CHITTUM; CHAMPNEY, 1995; PETROPOULOS et al., 2009).

A azitromicina é indicada no tratamento de infecções dermatológicas, respiratórias e urogenitais causadas por *Streptococos* e *Estafilococos*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi* (agente da doença de Lyme), *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Campylobacter* sp e também estudos comprovam sua efetividade em alguns protozoários como *Leishmania* sp e *T. gondii* (BRAZ et al., 1999; KATZUNG, 2006; SINAGRA et al., 2007; LOPES, 2008).

Pesquisa realizada por Sinagra e colaboradores (2007) demonstrou a atividade da azitromicina contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em hamsters infectados. A azitromicina oral em dose de 450mg/kg não

teve atividade contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Entretanto, para infecções devidas à *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a azitromicina mostrou atividade significativa em relação aos controles.

A azitromicina também pode inibir o crescimento de taquizoítas de *T. gondii* *in vitro*. Esse medicamento atua inibindo a síntese protéica do parasito, porém o sítio de ação e fixação da droga no parasito não foi ainda demonstrado. Em estudo da toxoplasmose aguda foi demonstrado que a azitromicina tem seus efeitos potencializados quando combinada com pirimetamina ou sulfadiazina, juntos, esses medicamentos apresentaram resultados promissores no tratamento da toxoplasmose (DEROUIN, 1995; LESCANO et al., 2004).

Braz e colaboradores (1999) realizaram um trabalho utilizando camundongos infectados com *T. gondii* e tratados com a associação de azitromicina e pirimetamina. Este estudo revelou 100% de eficácia no tratamento da toxoplasmose pela associação desses medicamentos. Com o uso isolado da azitromicina, a eficácia foi de 60%.

A azitromicina também se mostrou parcialmente eficiente contra cistos de *T. gondii* (DEROUIN et al., 2000; PETERSEN, 2007). Tal composto, além de exercer atividade antimicrobial por meio da inibição da síntese de proteínas, atuando na subunidade 50S do ribossomo do protozoário (DEGERLI et al., 2003), também age sobre taquizoítas e bradizoítas de *T. Gondii*. No entanto, apresenta efeito tóxico sobre o fígado (DEGERLI et al., 2003; GRUJIC et al., 2005). Apesar desse medicamento apresentar resultados promissores no tratamento da toxoplasmose em roedores, o seu uso em humanos ainda é restrito (DEGERLI et al., 2003), além disso, faltam dados que efetivamente demonstrem a ação da azitromicina e suas conseqüências em uma abordagem congênita da toxoplasmose.

1.8. *Calomys callosus*

São cricetídeos sul-americanos com ampla distribuição no território brasileiro, de etologia bastante estudada que apresentam relevante importância por serem reservatórios naturais de *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO, 1973) e transmissores da febre hemorrágica Argentina (JOHNSON et al., 1965; JUSTINES; JOHNSON, 1969). Esses

animais também têm se mostrado altamente susceptíveis à doenças infecciosas e parasitárias como esquistossomose, leishmaniose (MELLO, 1977) e toxoplasmose (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998; FERRO et al., 2002), o que proporciona excelente modelo biológico para o estudo dessas doenças.

C. callosus apresentam susceptibilidade à cepa RH de *T. gondii*, podendo ocorrer o óbito desses animais oito dias após a infecção (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998). Fêmeas grávidas de *C. callosus* infectadas com tal cepa apresentam infecção de células trofoblásticas desde o início do processo de implantação do embrião. Com o uso da cepa ME-49, Ferro e colaboradores (2002) demonstraram a cinética da infecção dos diferentes compartimentos da placenta, bem como estabeleceram que a transmissão vertical da toxoplasmose só ocorre na fase aguda da infecção, semelhante ao observado na espécie humana.

Assim, este modelo animal apresenta a vantagem de simular uma situação clínica observada em humanos: a transmissão vertical da toxoplasmose durante a fase aguda da doença.

Adicionalmente permite a possibilidade de estudo para diferentes abordagens terapêuticas na prevenção da toxoplasmose congênita.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Utilizar *Calomys callosus* como modelo experimental da toxoplasmose congênita para avaliar a eficácia de drogas simulando uma situação clínica observada em humanos: a transmissão vertical da toxoplasmose durante a fase aguda da doença e possíveis consequências destes tratamentos para o feto.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

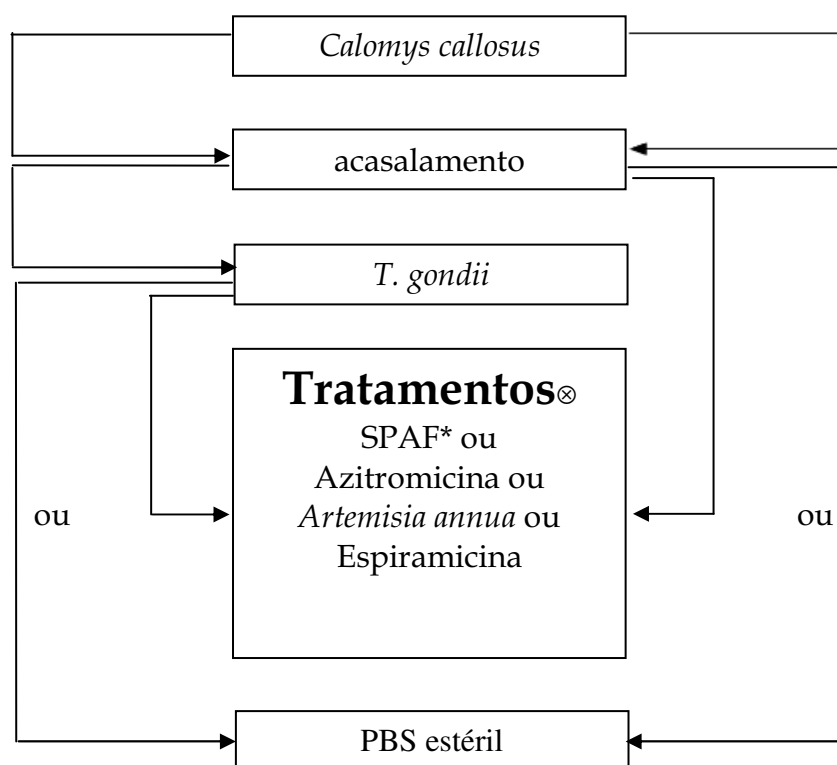
- Avaliar a ocorrência de alterações morfológicas ocorridas nos fetos em decorrência da administração dos seguintes compostos: associação de SPAF (sulfadiazina/pirimetamina/ácido folínico), azitromicina, infusão de *Artemisia annua* e espiramicina.
- Determinar a eficácia dos diferentes tratamentos na prevenção da transmissão vertical da toxoplasmose por meio das análises morfológicas, imuno-histoquímicas, bioensaio e reação de PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais de Experimentação

Foram utilizadas 96 fêmeas virgens de *C. callosus* (linhagem Canabrava), com cerca de 3 meses de idade com sorologia negativa para *T. gondii*, oriundos do biotério do Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia onde foram mantidas com água e ração granulada *ad libitum*, complementada com semente de girassol, milho e aveia.

Após o acasalamento e detecção de prenhez, as fêmeas foram distribuídas, de acordo com o tratamento, em quatro grupos conforme o tratamento (cada grupo foi composto por quatro subgrupos contendo seis fêmeas em cada). Animais foram inoculados ou não com a cepa ME-49 de *T. gondii* e posteriormente tratados com os diferentes medicamentos ou com PBS estéril, conforme fluxograma que se segue:



*SPAF- Associação de fármacos Sulfadiazina, Pirimetamina e Ácido folínico.

⊗- Sulfadiazina (Labdiazina®)- Novartis Farma

- Pirimetamina (Daraprim®)- Rhodia Farma

- Ácido folínico (Leucovorin®)- Interlab Farmacéutica
- Azitromicina (Zitromax®)- Pfizer
- Espiramicina (Rovamicina®)- Aventis

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

3.2. Manutenção da cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*

A cepa ME-49 foi mantida em *C. callosus* machos, mantidos no laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, através do inóculo de 20 cistos de *T. gondii* em 0,5 ml de solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS), pH 7,2 estéril, via oral, por meio de uma seringa adaptada. Após o período de 30 a 45 dias estes animais foram eutanasiados, seus crânios abertos, o encéfalo coletado e macerado com auxílio de pistilo e cadinho, banhados em 1ml de PBS e homogeneizados por aspiração em seringa de 5ml e agulha de 25X 7mm. O material foi ressuspenso em 10ml de PBS estéril e submetido à centrifugação a 500 g por 10 minutos, em temperatura ambiente, por duas vezes. Após lavagem, realizou-se a contagem de cistos pela adição de uma alíquota de 30µl de suspensão colocada entre lâmina e lamínula (24 X 24 mm) e observação ao microscópio de luz, com objetiva de 10X. A concentração foi ajustada para 20 cistos por animal em 0,5 ml de PBS estéril. Alíquotas desta amostra foram usadas para inóculo de machos para manutenção da cepa ou de fêmeas para condução do experimento.

3.3. Acasalamento, detecção de prenhez e inoculação de *T. gondii*

Fêmeas virgens de *C. callosus* com idade de três meses foram colocadas nas gaiolas dos machos as 18 horas, na proporção de duas fêmeas para cada macho, todos com sorologia negativa para *T. gondii*. Após 14 horas, verificou-se a presença da rolha vaginal (mistura de sêmen e secreção vaginal). A detecção da rolha vaginal definiu o primeiro dia de gestação.

No primeiro dia de gestação, os animais foram submetidos à sangria para a realização de testes sorológicos para confirmar a ausência de infecção por *T. gondii*. Para obtenção do sangue dos animais, estes foram anestesiados com 0,1 ml de uma mistura (1:1) de cetamina (Ketalar, Bayer S. A., São Paulo) e 2% de cloridrato de 2-(2,6 xilidino)- 5,6-dihidro- 4H - 1,3- tiazina (Rompun, Bayer S. A., São Paulo), a sangria foi realizada pelo plexo orbital com auxílio de um capilar de vidro. As amostras de sangue obtidas permaneceram à temperatura ambiente por 12 horas e após este período realizou-se a coleta das amostras de soro com auxílio de uma pipeta Pauster. As amostras foram estocadas a -20°C até o momento do uso.

Após obtenção de amostras de sangue, as fêmeas receberam 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME 49) em 0,5 ml de PBS estéril, via oral.

3.4. Tratamentos

3.4.1. Associação de drogas- SPAF (Sulfadiazina, Pirimetamina e Ácido folínico)

A partir do 14º dia de gestação/ inóculo as fêmeas foram submetidas ao seguinte tratamento medicamentoso via oral:

- Sulfadiazina: 75 mg/kg de peso corporal a cada 12 horas dissolvido em 0,5ml de PBS estéril por dois dias. Posteriormente, esta dose foi ajustada para 100 mg/kg de peso corporal dissolvida em 0,5 ml de PBS estéril, a cada 12 horas até o dia da eutanásia.

- Pirimetamina: 100 mg/kg de peso corporal dissolvido em 0,5ml de PBS estéril a cada 12 horas nos dois primeiros dias e 50 mg/kg de peso corporal dissolvido em 0,5ml de PBS estéril a cada 12 horas até o dia da eutanásia.

- Ácido folínico: 15 mg/kg de peso corporal a cada 24 horas durante o período de tratamento com pirimetamina.

3.4.2. Azitromicina

A partir do 4º dia de gestação/inóculo as fêmeas receberam, via oral, a cada 24 horas, através de uma seringa adaptada, 0,5ml de solução contendo PBS estéril e 300 mg de azitromicina por kg de peso corporal até o final da gestação.

3.4.3. Infusão de *A. annua*

A partir do 4º dia de gestação as fêmeas foram submetidas ao seguinte tratamento medicamentoso via oral com infusão de *A. annua*: 1 mg da planta seca diluído em 0,5 mL de água fervida a cada 8 horas até o dia da eutanásia.

Para obtenção da infusão de *A. annua*, folhas e galhos da planta foram secos a 40°C por 48 horas e, em seguida, moídos (DUARTE et al., 2005). O material seco e moído foi armazenado em local de pouca umidade para posterior preparação do extrato total. Esse extrato foi preparado como infusão a partir de dois gramas da planta seca dissolvidos em 1000 ml de água destilada fervida. A mistura foi agitada, coberta e deixada em repouso por 10 minutos. Em seguida, o material foi filtrado e a mistura resfriada à temperatura ambiente (RATH et al., 2004).

3.4.4. Espiramicina

A partir do 4º dia de gestação/ inóculo as fêmeas receberam, via oral, a cada 8 horas, por meio de seringa adaptada, 0,5 ml de solução contendo PBS estéril e 1 g de espiramicina por kg de peso corporal até o dia da eutanásia.

O quadro a seguir resume as dosagens utilizadas para cada animal. Estas foram adaptadas para o peso de *C. callosus*.

Medicamentos	Doses	Datas
<i>Espiramicina*</i>	✓ 0,15 mg/dose (3x ao dia) em 0,5ml de PBS estéril	A partir do 4º dia gestação-inóculo
<i>Sulfadiazina*</i>	✓ 1,125 mg/dose (2x ao dia, nos 2 primeiros dias) em 0,5ml de PBS estéril ✓ 1,5 mg/dose (2x ao dia, no restante do tratamento) em 0,5ml de PBS estéril	A partir do 14º dia gestação- inóculo
<i>Pirimetamina*</i>	✓ 0,025 mg/dose (2x ao dia, nos 2 primeiros dias) em 0,5ml de PBS estéril ✓ 0,025 mg/dose (1x ao dia, no restante do tratamento) em 0,5ml de PBS estéril	A partir do 14º dia gestação- inóculo
<i>Ácido Folínico*</i>	✓ 0,0075 mg/dia em 0,5ml de PBS estéril	A partir do 14º dia gestação- inóculo
<i>Azitromicina°</i>	✓ 9mg/dia em 0,5ml de PBS estéril	A partir do 4º dia gestação-inóculo
<i>Infusão de A. annua</i> ☐	✓ 1mg/dia em 0,5ml de água fervida (3X ao dia)	A partir do 4º dia gestação-inóculo
* As doses foram ajustadas para <i>C. callosus</i> , de acordo com Remington et al., 2001*; Degerli et al., 2003°; Oliveira, 2007☐		

3.4.5. Controles

Grupos controle de fêmeas infectadas ou não, receberam 0,5 ml de PBS estéril, via oral, nos mesmos intervalos de tempo que os respectivos grupos tratados.

3.5. Coleta do material

Os animais foram anestesiados como anteriormente descrito para sangria e obtenção de amostras de soro e em seguida, eutanasiados do 15º ao 20º dia de gestação/ inóculo para coleta das placentas e dos embriões onde foram processadas para as análises de bioensaio, morfológica, imuno-histoquímica, reação de PCR.

3.6. Bioensaio

Placentas e tecidos fetais (fígado e encéfalo) foram removidos sob condições estéreis, homogeneizados em 1 mL de PBS, pH 7,2 e inoculados intraperitonealmente em camundongos Swiss com sorologia negativa para *T. gondii* (GAZZINELLI et al., 1991). A avaliação do tratamento foi aferida com base na análise sorológica (15°, 30° e 45° dias pós-inóculo) dos animais receptores do inóculo de placentas e tecidos fetais por meio do teste ELISA (WILSON; NAKAME, 1978).

3.7. Processamento do material para análise morfológica

Para análise no microscópio de luz, amostras de placenta e embrião foram fixadas em formol a 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por 18 horas e processadas rotineiramente para inclusão em glicol metacrilato (Historesin, LKB, Bromma, Suécia). Cortes de 2 µm foram depositados em lâminas histológicas, corados com azul de toluidina e, posteriormente, analisadas e fotografadas em fotomicroscópio (Reichert Jung Polyvar, Lab. Austria).

3.8. Processamento do material para estudo imuno-histoquímico

Para a imunolocalização dos parasitos no microscópio de luz, as amostras provenientes de animais infectados e tratados ou não tratados, foram fixadas em formol 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 por 18 horas e processadas rotineiramente para inclusão em parafina. Cortes de 4 µm foram depositados em lâminas previamente recobertas com solução aderente de polivinil acrílico (PVA). Os cortes foram desparafinizados, hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e por fim em água corrente. Amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente com 5% de ácido acético para bloqueio da fosfatase endógena ou peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio da peroxidase endógena e posteriormente com 2% de soro normal de cabra ou BSA por 30 minutos a 37°C para bloqueio de sítios inespecíficos. Posteriormente, amostras foram incubadas por 12

horas à 4°C com soro de coelho anti-*T. gondii* e soro anti-BAG5 biotinilado (antígeno de bradizoíta-5) e posteriormente, com soro de cabra anti-IgG de coelho (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) por 30 minutos a 37°C. A reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC)-fosfatase alcalina (Biomeda, Foster, City, USA) e reveladas com fast red naphtol (Sigma) ou pelo complexo avidina/biotina-peroxidase reveladas com DAB (3,3'-diaminobenzidina) (DAKO Corporation, CA) quando apropriado. Em seguida, foram realizadas novas lavagens em TBS e água corrente e contra-coloração com hematoxilina de Mayer por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a diferenciação do corante em água amoniacal, as lâminas foram montadas com lamínulas em glicerina e o material analisado e fotografado em fotomicroscópio de luz (Reichert Jung Polyvar, Lab. Austria). Como controle da reação, parte do material foi incubado com soro normal de coelho como anticorpo primário.

As lâminas histológicas, provenientes das reações imunohistoquímicas, foram analisadas por imagens digitalizadas em microscópio de luz BX40 (Tokyo, Japão) da marca Olympus, com uso de objetiva de 40X, acoplado a uma câmera JVC TK-1085U, ligada a um computador por meio de placa digitalizadora "Translation" 3153. Foi utilizado o programa HL Image 97⁺⁺ para mensuração da carga parasitária.

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

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

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

3.9. Reação de PCR

A presença do DNA de *T. gondii* foi investigada pela reação de PCR como descrito por Grigg e Boothroyd (2001). Tecidos placentários e fetais foram tratados com 100mg/ml de proteinase K em tampão contendo 10nM de TRIS-HCL, 0,1M de EDTA, 0,5% de SDS, pH 8,0 à 50°C durante 3 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à extração em fenol/clorofórmio/alcoolisoamil (25:24:1, pH 8,0) e o DNA foi precipitado da fase aquosa pelo tratamento com 2,5 de etanol gelado (4°C). A PCR qualitativa detectou a presença de 35 cópias do gene B1 de *T. gondii* pelo uso de primers 5'TCTTCCCAGAGGTGGATTTC-3' (sense, nucleotides 151-171) e 5'CTCGACAATACGCTGCTTG-3' (antisense, nucleotides 682-663) (Invitrogen Life Technologies), amplificando um fragmento de 531 pb. Após a incubação inicial de 3 minutos a 95°C, as amostras foram submetidas a 38 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento por 1,2 minutos a 62°C e extensão por 2 minutos a 72°C (SILVA et al., 2002). Produtos da PCR foram analisados em gel de 1% de agarose contendo 0.5 µg/ml de brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultra violeta.

3.10. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

Placas de poliestireno (Corning®, New York- USA) foram sensibilizadas com o 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, a 4°C. Após lavagem das placas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBST), por três ciclos de 5 minutos. Foi adicionado 50 µl/ poço das amostras de soros diluídas a 1:32 em PBST para pesquisa de anticorpos nas amostras de *C. callosus* e 1:16 nas amostras de camundongos, em duplicata. Paralelamente, foram adicionadas amostras de soro controle positivo e negativo nas mesmas diluições. Como controle do conjugado, foram omitidas as amostras de soro, adicionando-se em seu lugar 50 µl de PBST. Após incubação de 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas três vezes em PBST durante 5 minutos. O conjugado IgG de coelho anti-gamaglobulina de *C. callosus*

marcado com peroxidase ou IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co. St Louis, EUA) foi adicionado na diluição de 1:500 e 1:1000, respectivamente, em PBS-T e as placas incubadas por uma hora a 37°C. As placas foram lavadas como descrito anteriormente para posterior adição do substrato enzimático, peróxido de hidrogênio, a 0,03% em tampão cromógeno OPD (ortofenilenodiamina, Merck, Germany) diluídos em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0. Após adição da solução reveladora, as placas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente, em câmara escura. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de ácido sulfúrico 2 N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492 nm (WILSON; NAKAME, 1978). Os valores da absorbância foram determinados a 490 nm em leitor de ELISA (Metrolab 980, Argentina).

Para análise individual das placas, os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE), calculados segundo a fórmula: [Densidade Óptica das amostras/ valor do limiar de reatividade (*cut off*)]x 100, onde o *cut off* foi determinado pela média da absorbância de três controles negativos para cada espécime, acrescido duas vezes do desvio padrão (MADALENA, 1999).

3.11. Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos e manuseio do material biológico, dos reagentes, utilização dos equipamentos bem como manuseio e conduta com os animais foram realizadas de acordo com as normas de biossegurança segundo Chaves-Borges e Mineo (1997).

3.12. Análise Estatística

A avaliação das áreas de imunomarcações (mm²) entre os grupos foi realizada por meio do teste ANOVA (Graph Pad software, v.5.0, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos em valores de médias ± desvio padrão e diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 - Anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* em *C. callosus*

Testes realizados com amostras de soro, provenientes da sangria pré-inóculo das fêmeas bem como amostras do grupo controle negativo, não detectaram a presença de anticorpos anti-*T. gondii* (dados não mostrados). Os testes realizados com amostras de soro das fêmeas previamente inoculadas e coletadas no dia da eutanásia apresentaram-se positivos para o parasito.

4.2 - Análise morfológica dos tecidos placentários e fetais de *C. callosus*

Em todos os grupos experimentais, a placenta de *C. callosus* não apresentou alterações morfológicas, sendo visibilizadas as regiões típicas da placenta desses animais: camada decidual, zona juncional e zona do labirinto (FIG. 1a).

Na camada decidual, as células apresentaram aspecto globoso, além de células granulosas metriais em volta dos vasos sanguíneos maternos.

A zona juncional constituía-se de células trofoblásticas gigantes e células do espongiotrofoblasto. Células trofoblásticas gigantes apresentaram núcleo eucromático, com um ou mais nucléolos, e foram observadas envolvendo células do espongiotrofoblasto. Células do espongiotrofoblasto apresentaram-se em arranjo típico, com aspecto esponjoso, com amplos espaços entre as células (FIG. 1b).

A zona do labirinto mostrou-se a maior região da placenta sendo formada por células trofoblásticas amplamente banhadas por sangue materno extravasado. O sangue fetal apresentava-se contido em vasos sanguíneos fetais no interior do mesenquima do labirinto. A zona do labirinto apoiava-se em uma membrana basal espessa, a membrana de Reichert (FIG. 1c).

Mesmo não havendo alterações morfológicas nos tecidos placentários de fêmeas infectadas com *T. gondi* e tratadas observou-se parasitos nas três regiões da placenta (FIG. 1d-f). A figura 1e mostra uma estrutura semelhante a cisto em um corte de placenta de uma fêmea infectada e tratada com SPAF.

Todos os fragmentos de embriões analisados apresentaram morfologia preservada, permanecendo inalterados células, tecidos e órgãos.

Cabe ressaltar que a maioria das fêmeas tratadas com a infusão de *A. annua*, apresentaram sangramento vaginal e ausência de embrião. Além disso, dentre as seis fêmeas que compuseram este grupo, em três foram observadas embriões atrofiados (dados não mostrados).

4.3. Análise imuno-histoquímica

A reação de imunohistoquímica revelou a presença de *T. gondii* tanto em tecidos placentários e fetais de fêmeas infectadas, tratadas ou não tratadas.

Imunomarcações do parasito foram observadas na zona juncional da placenta de *C. callosus*, com imunomarcações para as formas taquizoítas menos evidentes no grupo tratado com SPAF (FIG. 2a) quando comparadas ao grupo tratado com PBS (controle) (FIG. 2b, c). O mesmo foi observado nos tecidos placentários provenientes de fêmeas tratadas com a infusão de *A. annua* (FIG. 2d) e espiramicina (FIG. 2e). Imunomarcações para as formas bradizoítas foram detectadas somente nos tecidos de animais tratados com SPAF e eutanasiados do 15º ao 19º dia de gestação/inóculo (dados não apresentados).

Os tecidos das fêmeas infectadas e tratadas com azitromicina apresentaram predominância de taquizoítas na zona do labirinto de placentas do 15º ao 19º dia de gestação/inóculo e nenhuma imunomarcação foi evidenciada nas placentas de fêmeas do 20º dia deste grupo.

A análise imunohistoquímica revelou predominância de formas taquizoítas no fígado de embriões oriundos das fêmeas infectadas e tratadas com todos os medicamentos exceto nos animais provenientes do grupo infectado e tratado com azitromicina. Em evidência destacam-se fragmentos de tecidos hepáticos de animais infectados e tratados com infusão de *A. annua* (FIG. 3a) e espiramicina (FIG. 3b).

4.4. Análise das áreas de imunomarcacão

Imunomarcacões de taquizoítas foram observadas em tecidos placentários das fêmeas submetidas à todos os tratamentos, entretanto placentas pertencentes ao grupo controle (animais infectados e tratados com PBS estéril) apresentaram quantidade de imunomarcacões significativamente superior ao grupo de fêmeas tratadas ($P<0.05$) (FIG. 4a). Além disso foi observado menor número de imunomarcacões nos tecidos placentários dos animais tratados com azitromicina quando comparadas aos demais grupos de tratamento ($P<0.05$) (FIG. 4a).

Imunomarcacões de bradizoítas foram também detectadas nos tecidos placentários de fêmeas pertencentes ao grupo controle, no entanto estas não foram vistas nos grupos de animais submetidos aos tratamentos com azitromicina, infusão de *A. annua* ou espiamicina. Áreas de imunomarcacões de bradizoítas só foram observadas no grupo tratado com SPAF, sendo mais evidenciadas neste grupo que no respectivo controle ($P<0.05$) (FIG. 4a).

Nos tecidos embrionários provenientes de fêmeas tratadas com SPAF, infusão de *A. annua* ou espiamicina foram detectadas número reduzido de imunomarcacões de taquizoítas em relação aos grupos de animais tratados com PBS estéril (FIG. 4b). Nos tecidos embrionários de fêmeas tratadas com azitromicina, não foram vistas imunomarcacões para taquizoítas (FIG. 4b).

As imunomarcacões de bradizoítas foram mais evidenciadas nos tecidos embrionários de fêmeas tratadas com SPAF em relação ao respectivo controle ($P<0.05$) (FIG. 4b) não sendo detectadas nos animais tratados com os demais fármacos ($P<0.05$) (FIG. 4b).

4.5. Bioensaio e PCR

Os resultados de bioensaio mostraram que camundongos inoculados com placentas de fêmeas de *C. callosus* infectadas e tratadas com PBS estéril, apresentaram soroconversão no 15º dia pós-inóculo. Por outro lado, camundongos inoculados com tecidos placentários de fêmeas infectadas e tratadas com SPAF apresentaram

soroconversão no 45º dia pós-inóculo. Resultados similares foram observados nas amostras de soro dos camundongos que receberam macerado de placenta de fêmeas tratadas com azitromicina. Entretanto, camundongos inoculados com tecidos embrionários destas fêmeas, não apresentaram soroconversão. Além disso, nas amostras de camundongos controle (receberam macerado de tecidos placentários e fetais de fêmeas não infectadas) não foram detectados anticorpos específicos para *T. gondii* (Tabela 1).

Os dados de bioensaio demonstraram ausência de anticorpos anti-*T. gondii* nas amostras provenientes de animais inoculados com fígado e encéfalo de embriões das fêmeas infectadas e tratadas com azitromicina. Diferente disso, amostras de camundongos inoculados com tecidos embrionários de animais tratados com SPAF, apresentaram soroconversão no 45º dia pós/inóculo (Tabela 1). Não houve soroconversão em camundongos inoculados com tecidos fetais não infectados com o parasito.

A presença de DNA de *T. gondii* em tecidos placentários de fêmeas infectadas e tratadas com SPAF, azitromicina, infusão de *A. annua* ou espiramicina foi detectada pela reação de PCR (Tabela 1 e FIG. 5). Já em tecidos embrionários provenientes de fêmeas tratadas com PBS estéril ou SPAF, ou infusão de *A. annua* ou espiramicina detectou-se DNA de *T. gondii* (FIG.5). Diferente disso, não foi detectado DNA do parasito nos tecidos embrionários de mães tratadas com azitromicina (Tabela 1 e FIG. 5).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos a eficiência dos tratamentos com Sulfadiazina, Pirimetamina e Ácido folínico (SPAF), azitromicina, infusão de *Artemisia annua* e espiramicina na prevenção da transmissão vertical da toxoplasmose em *C. callosus*.

Os nossos dados demonstraram que a morfologia da placenta não mostrou alterações em animais tratados. Observamos também que a cinética da infecção por *T. gondii*, em diferentes regiões da placenta de fêmeas submetidas aos diversos tratamentos, foi semelhante à observada na placenta de fêmeas não tratadas. Nos 17º e 18º dias de gestação/inóculo, parasitos foram observados nas células gigantes e na zona do labirinto. No 19º dia de gestação/inóculo os parasitos atingiram as células do espongiotrofoblasto. A infecção ocorreu primeiramente nas células trofoblásticas gigantes e na zona do labirinto e, posteriormente, no espongiotrofoblasto. Provavelmente, a infecção tardia do espongiotrofoblasto relaciona-se ao fato de ficarem isolados do sangue materno pelas células gigantes, diferente da zona do labirinto que é diretamente banhada pelo sangue materno (FERRO et al., 2002). As imunomarcações de *T. gondii* encontradas nos embriões apresentaram distribuição similar às descritas na literatura onde a região mais infectada foi o fígado, órgão alvo do parasito em casos de infecção congênita (FAVORETTO-JUNIOR et al., 1998).

Significante decréscimo de parasitos foi observado nos grupos das fêmeas tratadas com a associação de SPAF, embora esse tratamento não tenha impedido a transmissão vertical de *T. gondii*. Estudo realizado por Gagne (2001) demonstrou que tais medicamentos reduziram em até 70% os riscos da toxoplasmose congênita pois podem agir em sinergismo e são capazes de atravessar a barreira placentária.

Entre todos os grupos de animais tratados com diferentes fármacos, observou-se bradizoítas apenas em tecidos placentários e fetais de fêmeas tratadas com SPAF. Adicionalmente, as imunomarcações para bradizoítas em tecidos placentários e fetais foram detectadas em maior quantidade que nos respectivos controles, porém em menor número que taquizoítas. Angeloni (2006) e Santana (2006) também avaliaram a ação da associação de SPAF em *C. callosus* grávidas previamente infectadas com *T. gondii* e verificaram resultados similares aos observados neste trabalho, onde o

tratamento foi capaz de diminuir a transmissão materna e também, reduziu o número de taquizoítas em embriões. Este fato sugere que a ação antifolato proveniente da combinação de sulfadiazina e pirimetamina, pode diminuir a síntese de folato e consequentemente de DNA do parasito, dificultando a replicação dos mesmos. Bradizoítas foram visualizados em maior quantidade no grupo tratado, sugerindo que a combinação de drogas (SPAF) é capaz de induzir precocemente a cronificação da toxoplasmose. Estudos prévios conduzidos *in vitro*, demonstraram que o stress celular de *T. gondii* pode acarretar transformação precoce de taquizoítas em bradizoítas com a formação de cistos teciduais (LYONS, 2002; SULLIVAN; HAKIMI, 2006). A formação precoce de cistos pode estar relacionada à algum tipo de estratégia utilizada pelo parasito para evadir do mecanismo de ação das drogas e também da resposta imunológica (DUBEY, 2004; SULLIVAN; HAKIMI, 2006). Entretanto, em tecidos placentários de fêmeas tratadas com azitromicina, artemisinina e espiramicina, as imunomarcações para bradizoítas não foram evidenciadas, indicando a possibilidade deste tratamento atuar eliminando o parasito e não induzir seu encistamento. Particularmente a azitromicina, atua em formas taquizoítas e císticas de *T. gondii*, mostrando-se efetiva também contra bradizoítas (DEGERLI et al., 2003).

Similarmente aos achados com SPAF, os nossos resultados da imunohistoquímica, bioensaio e PCR, mostraram que os tratamentos com a infusão de *A. annua* e espiramicina não impediram a transmissão vertical da toxoplasmose. Entretanto, foi observado que nos grupos tratados com estes compostos, houve significativo decréscimo na quantidade de parasitos quando comparados com os respectivos controles.

A infusão de *A. annua* apresenta diversos compostos como sesquiterpenos, flavonóides, cumarinas, esteróides, compostos alifáticos e artemisinina (BHAKUNI et al., 2001; BILIA et al., 2006; HARTWIG et al., 2009). O mecanismo pelo qual a artemisinina inibe a replicação de *T. gondii* envolve a desregulação na secreção de proteínas do micronema, que são cálcio-dependentes. A artemisinina inibe o armazenamento de cálcio no retículo endoplasmático do parasito impedindo,

portanto, a secreção dessas proteínas utilizadas no processo de invasão celular (LAVINE; ARRIZABALAGA, 2007; NAGAMUNE et al., 2007; KRISHNA et al., 2009).

Ou-Yang e colaboradores (1990) trabalhando com fibroblastos infectados com *T. gondii* e tratados com artemisinina e derivados, observaram relação direta entre a diminuição da carga parasitária e o tempo de exposição aos compostos. Adicionalmente, pesquisa realizada por Oliveira (2007) demonstrou potencial utilização do extrato de *A. annua* no controle da infecção por *T. gondii* devido ao efeito inibitório direto deste composto contra o parasito em culturas celulares de fibroblastos humanos em duas diferentes condições de tratamento e comparadas com a medicação usual - sulfadiazina. Na primeira condição, parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram pré-tratados com diferentes concentrações do extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina e então adicionados à cultura de fibroblastos, resultando em doses inibitórias de $DI_{50} = 103,6 \mu\text{g/mL}$ para o extrato e $DI_{50} = 2,5 \mu\text{g/mL}$ para a sulfadiazina, indicando que uma menor quantidade em massa desta última droga foi capaz de inibir a infecção pelo parasito. Entretanto, para melhor comparar a real efetividade das drogas contra o parasito, um índice terapêutico foi calculado considerando-se não somente a capacidade inibitória de infecção, mas também a sua toxicidade para as células. Desta forma, o extrato total de *A. annua* mostrou ser três vezes mais eficiente que a sulfadiazina ($IT = 544.5$ versus $IT = 194.4$), evidenciando assim que o extrato da planta parece agir de forma mais direta e efetiva sobre o parasito. Em uma segunda condição, Oliveira (2007) demonstrou que o tratamento de fibroblastos humanos infectados com a cepa RH de *T. gondii* com o extrato total de *A. annua* e sulfadiazina apresentou índices terapêuticos similares e, portanto, eficácia comparável entre as duas drogas.

Sarciron e colaboradores (2000) investigando o efeito de artemisinina e seus derivados sintéticos no controle da infecção de células da linhagem mielomonocítica (THP-1) infectadas com uma cepa avirulenta (DUR) de *T. gondii*, observaram que o crescimento do parasito não foi completamente inibido, apresentando taxas de inibição do parasito em torno de 70%. Holfels e colaboradores (1994) demonstraram, entretanto, eficiente inibição dose-dependente da infecção pela cepa RH de *T. gondii*

em linhagens de enterócitos tratadas com artemeter, um derivado semi-sintético da artemisinina.

Importante destacar que, neste trabalho, algumas fêmeas tratadas com a infusão de *A. annua* não engravidaram mesmo sendo detectada a presença da rolha vaginal (dados não apresentados) além de sangramento vaginal, sugerindo quadro abortivo. Além disso observou-se embriões em processo de atrofia.

Dellicour e colaboradores (2007) relataram a relação entre artemisinina e efeitos adversos na gestação. Esses autores observaram risco do uso deste composto, principalmente no primeiro trimestre gestacional, uma vez que há embrioletalidade e má-formação do embrião após utilização do mesmo. A embriotoxicidade da artemisinina e seus derivados também foi descrita por outros autores (CLARK et al., 2004; BOARETO et al., 2008; HARTWIG et al., 2009). Está comprovado que esse composto gera depleção de eritroblastos e consequentemente, de células vermelhas do sangue culminando em anemia, danos teciduais e morte do embrião, além disso, são comuns anormalidades cardíacas e a má-formação do mesmo, podendo ocorrer inclusive aborto (CLARK et al., 2004; BOARETO et al., 2008; LONGO et al., 2008).

De acordo com Montoya e Liesenfeld (2004) a efetividade do tratamento da toxoplasmose congênita é baseada em dois critérios: taxa de transmissão da mãe para o feto e na prevalência e severidade das seqüelas. Portanto, apesar dos trabalhos apontarem a efetiva utilização da artemisinina e seus derivados no controle de *T. gondii* nossos dados corroboram com os achados na literatura (CLARK et al., 2004; BOARETO et al., 2008; HARTWIG et al., 2009), onde esta droga mostrou-se capaz de induzir alteração embrionária, tornando sua utilização não indicada no tratamento da toxoplasmose congênita.

Todros e colaboradores (2006) demonstraram que a espiramicina possui atividade toxoplasmicida. Como os demais macrolídeos, este medicamento inibe a síntese protéica do parasito pela ligação à subunidade 50S do ribossomo interferindo na formação de complexos de iniciação da síntese protéica (KATZUNG, 2006; PETROPOULOS et al., 2009). Nossos dados mostraram que havia infecção fetal mesmo quando as mães foram submetidas ao tratamento com espiramicina. Isto demonstra que esta droga foi incapaz de impedir a transmissão materno-fetal da

toxoplasmose. Diferentemente do observado por nós, Rorman e colaboradores (2006) observaram a eficiência da espiramicina na prevenção da transmissão vertical da toxoplasmose. Já Grujić e colaboradores (2005) e Elsheikha (2008), observaram que a espiramicina possui escassa capacidade de reduzir a transmissão do parasito para o feto. Isso se confirma também pelos achados de Gratzl e colaboradores (2002) que verificaram que este fármaco é capaz de inibir o crescimento de *T. gondii in vitro* porém, não elimina a infecção. Adicionalmente, acredita-se que a espiramicina atue na maturação de linfócitos e na secreção de citocinas do indivíduo mas não apresenta efeito direto sobre o parasito (LEFEVRE-PETTAZZONI et al., 2007).

Com o uso da espiramicina não observou-se embriões atrofiados ou portadores de quaisquer alterações embrionárias aparentes, contudo não se pode afirmar, com base neste estudo, que a espiramicina não possua nenhum efeito danoso aos embriões.

Em contraste aos resultados encontrados nos tratamentos com SPAF, infusão de *A. annua* e espiramicina, os dados obtidos por meio da imunohistoquímica, bioensaio e PCR mostraram que a infecção ficou restrita aos tecidos placentários em fêmeas tratadas com azitromicina. A azitromicina atua preferencialmente na síntese de proteínas de *T. gondii* (BECKERS et al., 1995; DEROUIN, 1995).

Outro fator favorável na utilização da azitromicina é sua capacidade de atuar tanto na fase crônica quanto aguda da toxoplasmose (BURGESS, 1999). Estudo realizado por Torkildsen e colaboradores (2008) mostrou que este composto é rapidamente absorvido e apresenta elevadas concentrações teciduais por prolongado tempo. Além disso, Abelson e colaboradores (2007) demonstraram a eficiência da azitromicina em eliminar cepas resistentes de *T. gondii*, sugerindo que esse antibiótico possa exibir maior eficácia *in vivo* que *in vitro*.

A eficácia deste fármaco também foi comprovada em um trabalho realizado por Degerli e colaboradores (2003) demonstrando que quando camundongos infectados foram tratados com 300 mg/kg/dia de azitromicina, não ocorreu óbito dos mesmos e não foram encontrados *T. gondii* no fígado, baço e encéfalo destes animais, revelando-se um promissor tratamento para toxoplasmose. Além disso, estes mesmos autores constataram que a azitromicina possui atividade contra formas

taquizoíticas e císticas de *T. gondii*. Nos casos de toxoplasmose aguda, a eliminação do parasito de tecidos cerebrais é menor do que no pulmão dos camundongos.

É relevante destacar também que, pelo fato de ser comum o uso de macrolídeos no combate às infecções bacterianas, Bar-Oz e colaboradores (2008) analisaram pacientes no primeiro trimestre de gestação que faziam uso concomitante desses medicamentos, para determinar se a utilização destes, incluindo a azitromicina, promovia o aumento dos riscos de má-formação de embriões. Os autores observaram que a azitromicina, que sabidamente atravessa a placenta, diferente dos demais macrolídeos, não aumentaram os riscos de má-formação embrionária.

A eficácia da azitromicina na redução da transmissão congênita de *T. gondii* foi confirmada em recente estudo pela análise dos olhos de fetos de *C. callosus*, bem como da infecção adquirida em adultos por meio da análise do tecido cerebral de fêmeas prenhes e de machos imunocompetentes. Os resultados demonstraram que a azitromicina reduziu significativamente a quantidade de parasitos em tecido cerebral das fêmeas tratadas com azitromicina quando comparados com associação de SPAF, e além disso, nas regiões oculares fetais, não foram detectados parasitos nos animais tratados com azitromicina (LOPES, 2008).

Assim, devido à gravidade potencial da toxoplasmose congênita e do reduzido número de estudos experimentais que avaliam a eficiência de diferentes drogas, os resultados aqui apresentados adicionam dados e novas perspectivas para o tratamento desta infecção.

Finalmente, apesar das diferenças óbvias entre modelos experimentais e a espécie humana, acreditamos que estudos futuros devem considerar a possibilidade do uso da azitromicina no tratamento da toxoplasmose congênita.

6. CONCLUSÕES

- As placentas de *C. callosus* não apresentaram alterações morfológicas quando submetidas aos tratamentos com associação de fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico associados (SPAF), azitromicina, infusão de *Artemisia annua* e espiamicina.
- Os dados morfológicos, imuno-histoquímicos, de bioensaio e PCR, demonstraram que todos os tratamentos administrados diminuíram a carga parasitária nos tecidos placentários e fetais de *C. callosus*.
- Animais tratados com azitromicina não transmitiram *T. gondii* à sua prole, sugerindo que este fármaco atue efetivamente na prevenção da toxoplasmose congênita.

7. FIGURAS

FIG. 1

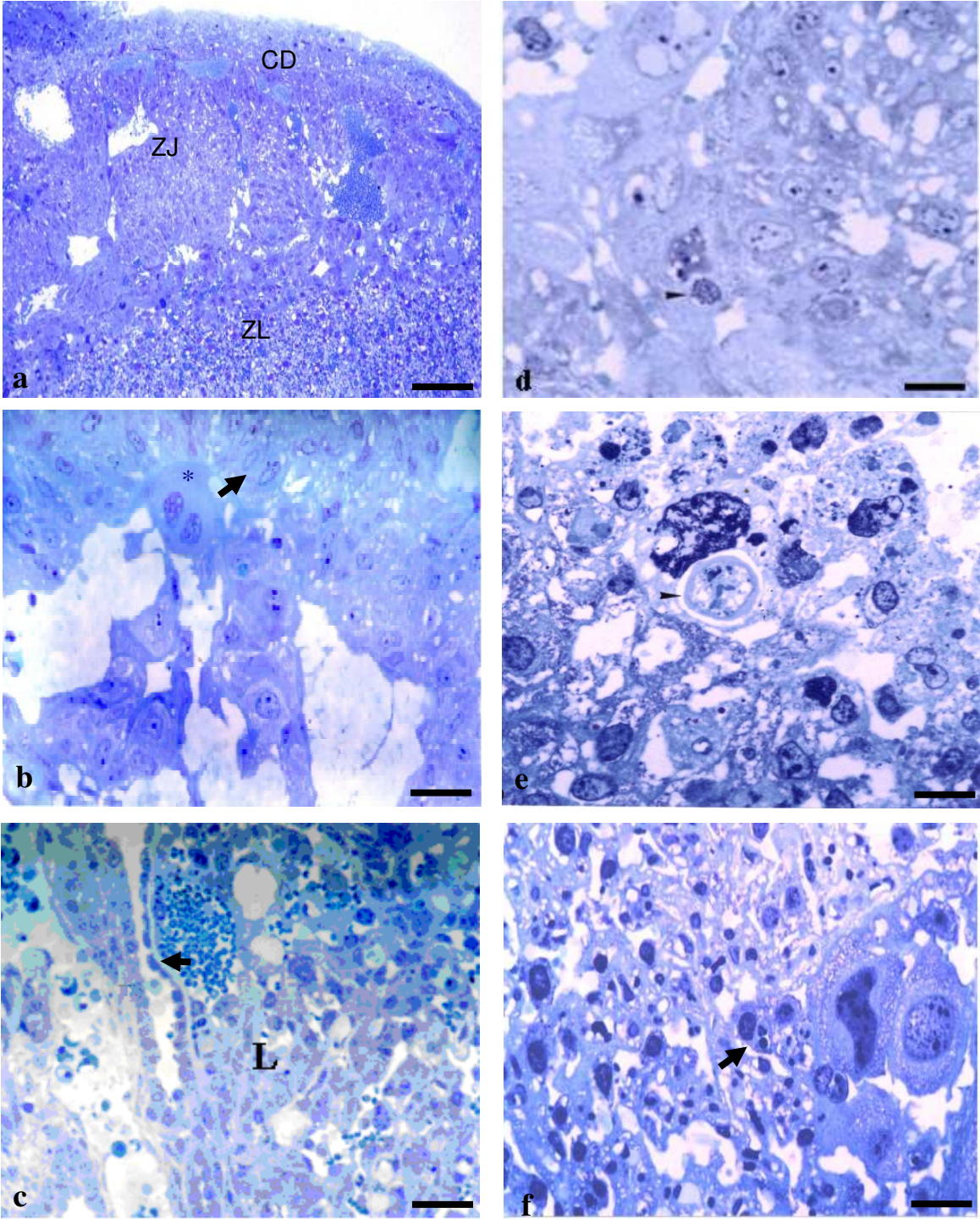


FIG. 2

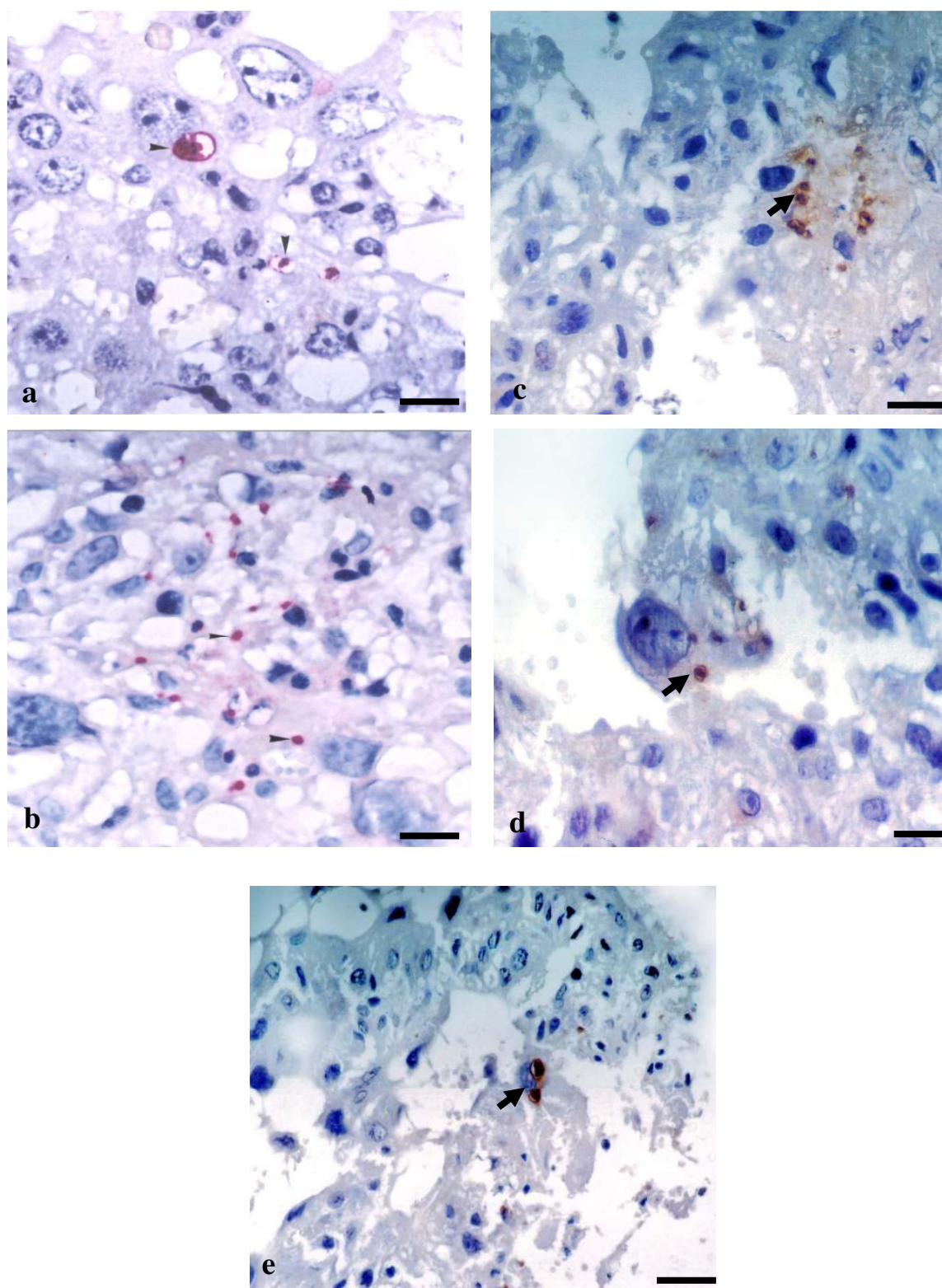


FIG. 3

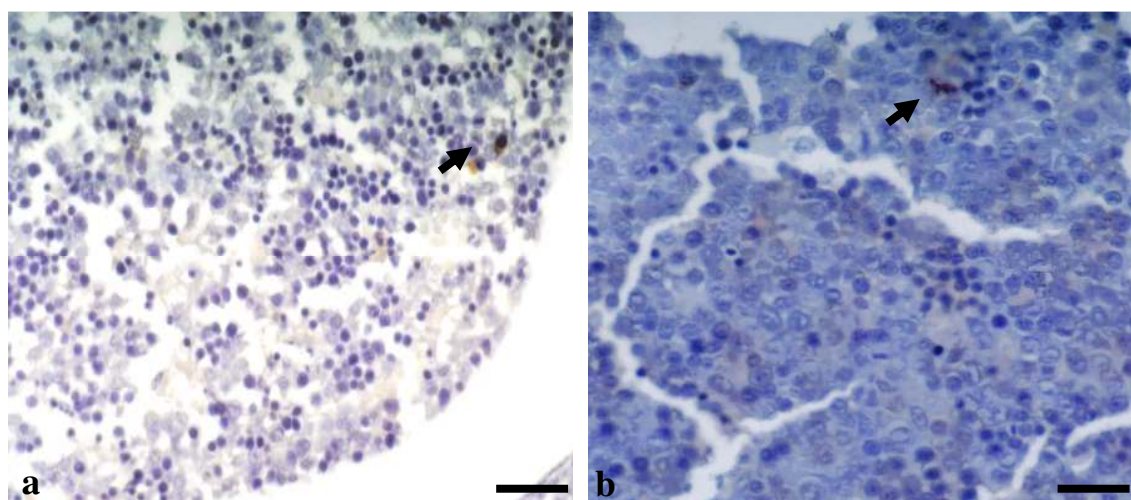


FIG. 4

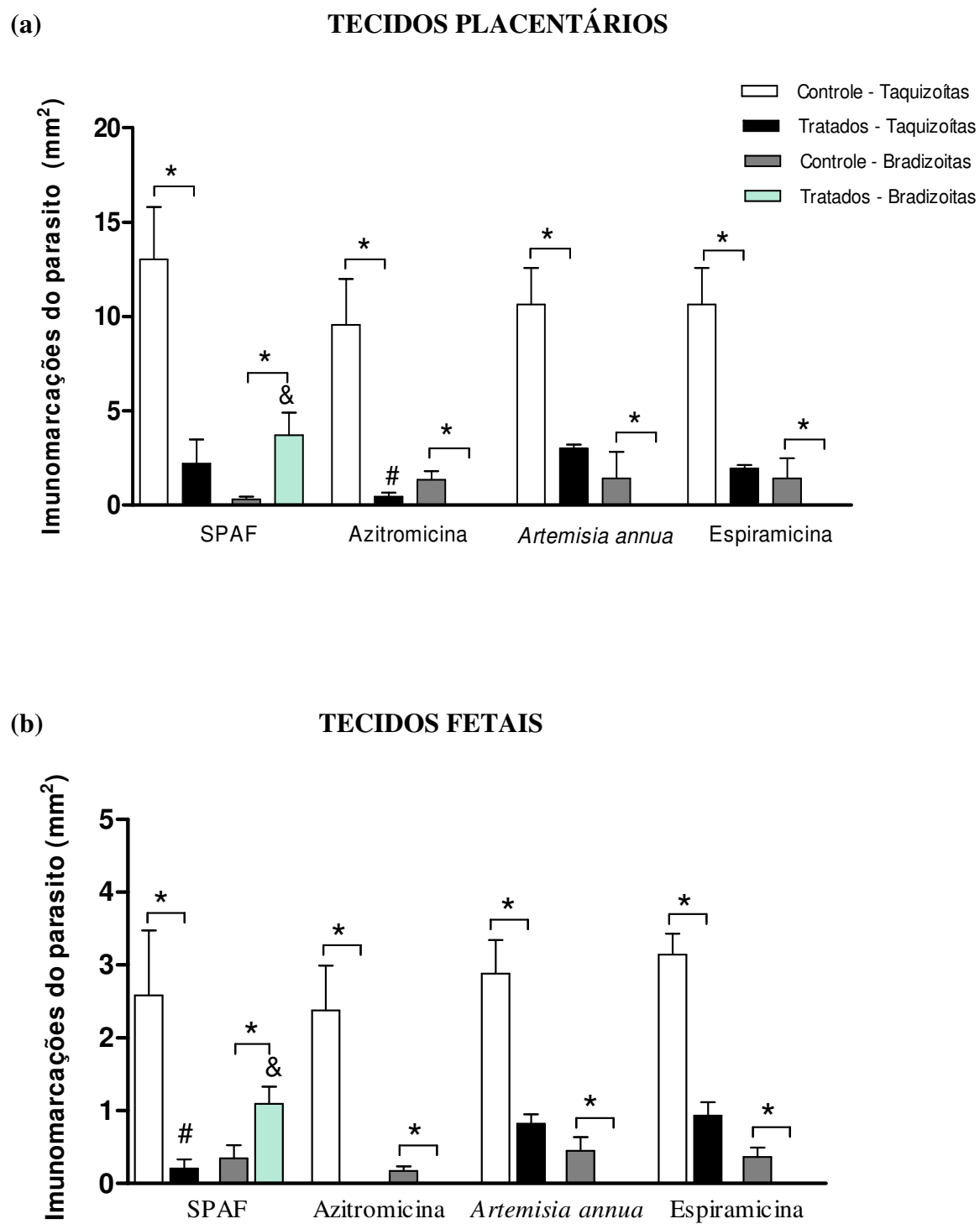


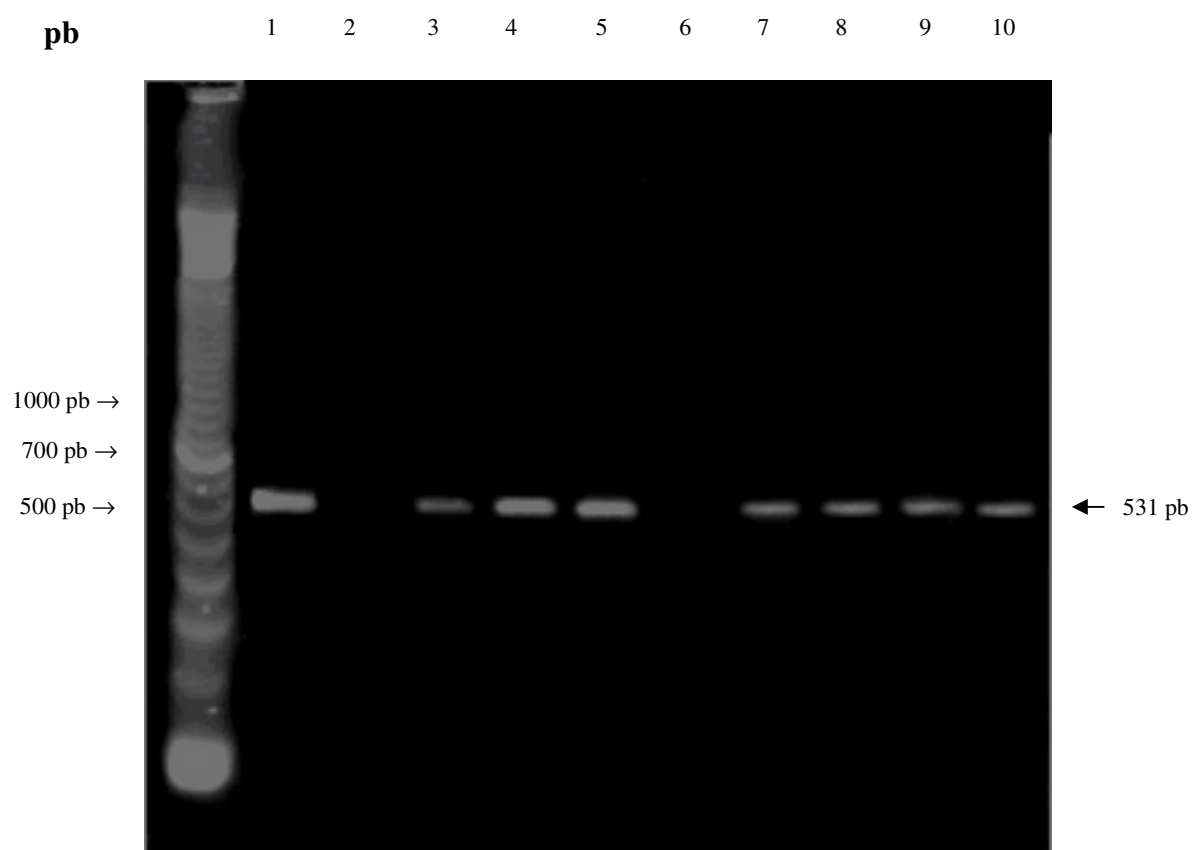
FIG. 5

Tabela 1. Dados obtidos da imunohistoquímica, bioensaio e reação de PCR realizados para a detecção de *Toxoplasma gondii* em tecidos placentários e fetais de fêmeas de *Calomys callosus* submetidas à infecção por *T. gondii* e à diferentes tratamentos

Grupos de animais ^a	Detecção do Parasito					
	Imunohistoquímica		Bioensaio		PCR	
	Placenta	Tecidos fetais	Placenta	Tecidos fetais	Placenta	Tecidos fetais
Associação de Drogas SPAF)						
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
Azitromicina						
15	+	-	+	-	+	-
16	+	-	+	-	+	-
17	+	-	+	-	+	-
18	+	-	+	-	+	-
19	+	-	+	-	+	-
20	-	-	-	-	-	-
Artemisia annua						
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
Espiramicina						
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+

^a Animais foram oralmente infectados com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME49) no 1º dia de gestação e tratados com associação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico, azitromicina, infusão de *Artemisia annua* e espiramicina como descrito no item material e métodos. Placenta e tecidos fetais foram analisados do 15º ao 20º dia de gestação/inóculo. + presença de parasitos; - ausência de parasitos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ABDALLAH, R. B.; AUON, K.; SIALA, E.; SOUISSI, O.; MAATOUG, R.; HLIOUI, S.; BOURATBINE, A. La toxoplasmose congénitale en Tunisie: analyse Clinique et biologique de 11 cas. **Arquives des Pédiatrie**, França, v.16, n. 2, p. 118-122, Feb, 2009.

ABOUT-BACAR, A.; PFAFF, W. A.; GEROGES, S.; BRU, V.L.; FILISETTI, O. V.; ANTONI, E.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and Gamma Interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v. 72, n. 3, p. 1397-1401, March, 2004.

ABELSON, M.; PROTZKO, E.; SHAPIRO, A.A randomized Trial assessing the clinical efficacy and microbial eradication of 1% azithromycin ophthalmic solution vs tobramycin in adult and pediatric subjects with bacterial conjunctivitis. **Clinical Ophthalmologic**, Estados Unidos, v.1, p. 177-182, Aug, 2007.

ANGELONI, M. B. **Ação de fármacos sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico em placentas de *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) experimentalmente infectadas com *Toxoplasma gondii***. 2006. Monografia-Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006

AGTMAEL, M. A. V.; EGGELTE, T. A; BOXTEL, C. J. V. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **Trends Pharmacological Sciences**, England, v. 20, n. 5; p. 199-205, May, 1999.

*Segundo Normas da ABNT 2005

ALIBERTI, J. Host persistence exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, Estados Unidos, v. 5, n. 2, p. 162-170, Jun, 2005.

AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. **Anais Academia Nacional Medicina**, Brasil, v.155, n. 4, p. 224-225, 1995.

ANDRADE, G. M. Q.; CARVALHO, A. L.; CARVALHO, I. R.; MELLO, B. F.; TIBÚRCIO, F. R.; CASTRO, F.C. Toxoplasmose na gestante e no recém nascido- Estudo de 86 pares de mãe-filho atendidos no período de 1996-99 no ambulatório de infectologia pediátrica do HC_UFMG. **Revista Médica de Minas Gerais, Belo Horizonte**, Brasil, v. 11, n.4, p. 202-207, May, 2001.

ASHBURN, D.; JOSS, A. W.; PENNINGTON, T. H.; HO-YEN, D. O. IgA, IgE and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasmose infection in pregnancy. **Journal Clinical Patology**, London, v. 15, n.4, p. 312-315, Feb, 1998.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta 1. **Clinical and Experimental Immunology**, England, v. 151, n. 3, p. 536-545, March, 2008.

BAR-OZ, B.; DIAV-CITRIN, O.; SHECHTMAN, S.; TELLEM, R.; ARNON, J.; FRANCETIC, I.; BERKOVITCH, M.; ORNOY, A. Pregnancy outcome after gestational exposure to the new macrolides: A prospective multi-center observational study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Ireland, v. 141, p.31-34, Aug, 2008.

BEAZLEY, D. M. & EGERMAN, R. S. Toxoplasmosis. **Seminars in perinatology**, Estados Unidos, v. 2, p. 332-338, Aug, 1998.

BECKERS, C. J.; ROSS, D. S.; DONALD, R. G.; LUFT, B. J.; SCHWAB, J. C.; CAO, Y.; JOINER, K. A. Inhibition of cytoplasmic and organellar protein synthesis in *Toxoplasma gondii*. Implications for the target of macrolide antibiotics. **Journal Clinical Investigations**, Estados Unidos, v. 95, n. 1, p. 367-76, Jan, 1995.

BHAKUNI, R. S.; JAIN, D. C.; SHARMA, R. P.; KUMAR, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. **Current Science**. Bangalore, v. 80, n.1, p.35-48, jan, 2001.

BILIA, A. R.; MELILLO, P. M.; BERGONZI, M. C.; VINCIERI, F. Simultaneous analyses of artemisinin and flavanoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. **Phytomedicine**, New York, v. 13, n.1, p. 487-493, Feb, 2006.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Alemanha, v. 64, n. 7, p. 607-623, Jul, 2000.

BOARETO, A. C.; MULLER, J. C.; BUFALO, A. C.; BOTELHO, G. G. K.; ARAUJO, S. L.; FOGLIO, M. A.; MORAIS, R. N.; DALSENTER, P. R. Toxicity of artemisinin (*Artemisia annua* L.) in two different periods of pregnancy in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, Estados Unidos, v. 25, n. 2, p. 239-246, Feb, 2008.

BOOTHROYD, J.C.; DUBREMETZ, J. Kiss and spit: the dual role of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Review Microbiology**, England, v. 6, n.1, p. 79-88, Jan, 2008.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 5, n. 4, p. 438-442, Aug, 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**, Estados Unidos, v. 192, p. 564-571, May, 2005.

BRADLEY, P.J.; SIBLEY, L.D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current Opinion Microbiolog**, England, v. 10, n. 6, p. 582-7, Dec, 2007.

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

BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. **Drugs in pregnancy and lactation. A reference guide to fetal and neonatal risk**. 6º ed. Willians & Wilkins, 2002. 2144p.

BURGESS, D. S. Pharmacodynamic principles of antimicrobial therapy in the prevention of resistance. **Official Publication of the American College of Chest Physicians**. Estados Unidos, v. 115, n. 3, p. 195-235, March, 1999.

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, Brasil, v. 33, n. 3, p. 213-218, May-Jun, 1991.

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

CARRUTHERS, V.B. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. **International Journal Parasitology**, England, v. 36, n. 5, p. 595 – 600, May, 2006.

CARRUTHERS, V. B.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 10, p. 83–89, Feb, 2007.

CARRUTHERS, V. B.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. **Cellular Microbiology**, England, v. 1, p. 225-235, Nov, 1999.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança**. Uberlândia: EDUFU (editora UFU). 1997, 55p.

CHITTUM, H. S.; CHAMPNEY, W. S. Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells. **Current Microbiology**, England, v. 30, p. 273-279, May, 1995.

CLARK, R. L.; WHITE, T. E.; CLODES, A.; GAUNT, S. I.; WINSTANLEY, P.; WARD, S. A. Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit. **Reproductive Toxicology**, Estados Unidos, v. 71, p. 380-394, Dec, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Princípios éticos na experimentação animal, julho, São Paulo, 1991, p.1.

COMBE, C.L.; CURIEL, T. J.; MORETTO, M. M.; KHAN, I.A . NK cells help to induce CD8 (+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v. 73, n. 8, p. 4913-4921, Aug, 2005.

CORTEZ, E.; STUMBO, A. C.; DE CARVALHO, T. M.; BARBOSA, H. S., CARVALHO, L. NAD(P)H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. **The Journal of Parasitology**, England, v. 91, p. 1052-1057, Aug, 2005.

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

DELLICOUR, S.; HALL, S.; CHANDRAMOHAN, D.; GREENWODD, B. The safety of artemisinin during pregnancy: a pressing question. **Malária**, Brasil, p. 6-15, Feb, 2007.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 11, p. 569-588, Oct, 1998.

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

DEROUIN, F.; JACQZ-AIGRAIN, E.; THULLIEZ, P.; COUVREUR, J.; LEPORT, C. Cotrimoxazole for prenatal treatment of congenital toxoplasmosis? **Parasitology Today**, England, v. 16, n. 6, p. 254-256, Jun, 2000.

DHINGRA, V.; RAO, V. K.; NARASU, L. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. **Basic Life Science**, New York, v. 66, n. 4, p. 279-300, 1999.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M. PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA-UNICAMP. **Revista Plantas**, Brasi, v. 14, p. 11-33, Sep, 2005.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis-a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, Dec, 2004.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachizoites, bradizoites, and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissyes of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal Veterinary Research**, Estados Unidos, v. 54, n. 2; p. 270-73, Feb, 1993.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; ULRICH, V.; GILL, J.; CARSTENSEN, M.; SUNDAR, N.; KWOK, O. C. H.; THULLIEZ, P.; MAJUMDAR, D.; SU, C. Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from foetuses of different gestational ages. **International Journal for Parasitology**, England, v. 38, p. 1057-1063, Jul, 2008.

DUMÈTRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.; DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 153, p. 209-213, May, 2008.

DUNAY, I.R.; HEIMESAAT, M. M.; BUSHRAB, F. N.; MÜLLER, R. H.; STOCKER, H.; ARASTEH, K.; FITZNER, M. K. R.; BORNER, K.; LIESENFELD, O. Atovaquone Maintenance Therapy Prevents Reactivation of Toxoplasmic Encephalitis in a Murine Model of Reactivated Toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.43, n. 9, p. 4848-4854, Dec, 2004.

ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. **Public Health**, England, v. 122, n. 4, p. 335-353, Apr, 2008.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal Comparative. Pathology**, England, v. 126, n. 2-3, p. 79-94, Feb/ Apr, 2002.

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

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto - Imunes**. 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 278-86, 2001.

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

FERREIRA, A. M.; VITOR, R.W.A.; GAZZINELLI, R.T.; MELO, M.N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, Netherlands, n. 6, p. 22-31, Jan, 2006.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MORTARA, R. A.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitology Research**, Alemanha, v. 85, n. 8-9, p. 647-654, Aug, 1999.

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**, Estados Unidos, v. 70, n. 12, p. 7089-7094, 2002.

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

FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around us. **Bioscience**, Estados Unidos, v. 23, n. 3, p. 343-352, 1973.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MENDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA, O.; GONZALEZ, M. *Toxoplasma gondii*: Partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. **Experimental Parasitology**, Estados Unidos, v.112, p. 8-12, Jan, 2006.

GAGNE, S. S. Toxoplasmosis. **Primary Care Update for Obstetricians and Gynecologists**, Estados Unidos, v. 8, p. 122-126, May, 2001.

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**, Baltimore, v. 11, n. 7, p. 3672-3681, Oct, 1993.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4 and CD8 T Lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 146, p. 286-292, Jan, 1991.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARFON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4 T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . **Journal Immunology**, Estados Unidos, v. 157, p. 798-805, Jul, 1996.

GOOLDMAN; GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10^o ed. Editora: McGraw-Hill. Rio de Janeiro, 2001.

GONÇALVES, A. C. P.; YAMAMOTO, J. H. Toxoplasmose ocular: Aspectos imunológicos. **Revista Medicina São Paulo**, Brasil, v. 76, n. 2, p. 130-141, 1997.

GRATZL, R.; SODECK, G.; PLATZER, P.; JÄGER, W.; GRAF, J.; POLLAK, A.; THALHAMMER, T. Treatment of toxoplasmosis in pregnancy: concentrations of spiramycin and neospiramycin in maternal serum and amniotic fluid. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Alemanha, v. 21, p. 12-16, Jan, 2002.

GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C. Rapid identification of virulent type 1 strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 398-400, Jan. 2001.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Annali Dell Istituto Superiore di Sanità**, Roma, v. 40, p. 67-70, 2004.

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

HAJJ, H.E.; LEBRUN, M.; FOURMAUX, M.N.; VIAL, H.; DUBREMETZ, J.F. Characterization, biosynthesis and fate of ROP7, a ROP2 related rhoptry protein of *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biochemical Parasitology**, Netherlands v. 146, n. 1, p. 98-100, Mar, 2006.

HARTWIG, C. L.; ROSENTHAL, A. S.; DANGELO, J.; GRIFFIN, C. E.; POSNER, G. H.; COOPER, R. A. Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is endoperoxidase-dependent. **Biochemical Pharmacology**, England, v. 77, n. 3, p. 322-336, Feb, 2009.

HEEMSKERK, W.; SCHALLIG, H.; PITERS, B. P. The world of *Artemisia* in 44 questions. **The Royal Tropical Institute**, Netherlands, March, 2006. 92p.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, Verlag, v. 3, n. 2, p. 84-105, Jun. 2003.

HOLFELS, E.; MCAULEY, J.; MACK, D.; MILHOUS, W.K.; MCLEOD, R. In vitro effects of artemisinin ether, cycloguanil hydrochloride (alone and in combination with sulfadiazine), quinine sulfate, mefloquine, primaquine phosphate, trifluoperazine hydrochloride, and verapamil on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 38, n.6, p. 1392-6, Jun. 1994.

HOWE, D, K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. **Experimental Parasitology**, Estados Unidos, v. 78, n. 2, p. 242-245, Dec, 1994.

HSU, K.; JOHNSON, J.; FLORENS, L.; FRAUNHOLZ, M.; SURAVAJJALA, S.; DILULLO, C.; YATES, J.; ROOS, D. S.; MURRAY, J. M. Cytoskeletal components of an invasion machine- the apical complex of *Toxoplasma gondii*. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 2, n. 2, Feb, 2006.

HUEBRA, M. J. G. de la; VINCENT, U.; BORDIN, G.; RODRÍGUEZ, A. R. Characterisation of dirithromycin and spiramycin using high performance liquid chromatography and direct infusion mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 503, n. 2, p. 247-256, Feb, 2004.

JEFFREY, D.; KRAVETZ, M. D.; DANIEL, G.; FEDERMAN, M. D. Toxoplasmosis in pregnancy: Knowledge of risk factors. **Infectious Diseases Obstetrician Gynecology**, Estados Unidos, v. 13, n. 3, p. 161-165, sep, 2005.

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

JOHNSON, K. M.; MACKENZIE, R. B.; WEBB, P. A.; KUNS, M. L. Chronic infection of rodents by Machupo virus. **Science**, Estados Unidos, v. 150, n. 703, p. 1618-1619, Dec, 1965.

JONES, J.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. **American Family Physician**, Estados Unidos, v. 67, p. 2131-2138, May, 2003.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, Estados Unidos, v. 56, n. 5, p. 296-305, May, 2001.

JONES-BRANDO, L.; TORREY, E. F.; YOLKEN, R. Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. **Schizophrenia Research**, Estados Unidos, v. 62, p. 237-244, Aug, 2003.

JONES-BRANDO, L.; D'ANGELO, J.; POSNER, G. H.; YOLKEN, R. *In vitro* inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 50, n.12, p. 4206-8, Dec. 2006.

JUSTINES, G.; JOHNSON, K. M. Immune tolerance in *calomys callosus* infected with Machupo virus. **Nature**, England, v. 222, n. 198, p. 1090-1091, Jun, 1969.

KASPER, L. H.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: immunology and molecular biology. In: WARREN, K. S. (ed) **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection**, Cambridge, M. A., 1993.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002, cap. 18, p. 147-156.

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

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, England, v. 34, n.3, p. 423-432, May, 2004.

KOREN, G.; PASTUSZAK, A.; ITO, E. Drugs in pregnancy. **The New England Journal of Medicine**, Estados Unidos, v. 16, n. 338, p. 1128-1137, Apr, 1998.

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

KRISHNA, S.; BUSTAMANTE, L.; HAYNES, R. K.; STAINES, H. M. Artemisinins: their growing importance in medicine. **Trends in Pharmacological Sciences**, England, v. 29, n.1, p. 520-527, Oct, 2009.

LANS, C.; TURNER, N.; KHAN, T.; BRAUER, G. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canadá. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n.3, p. 325-340, Sep, 2007.

LAVINE, M. D.; ARRIZABALAGA, G. Invasion and egress by the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*: potential targets for the development of new antiparasitic drugs. **Current Pharmaceutical Desingn**, Netherlands, v. 13, n.6, p. 641-651, Jan, 2007.

LEFEVRE-PETTAZZONI, M.; BISSERY, A.; WALLON, M.; COZON, G.; PEYRON, F.; RABILLOUD, M. Impact of spiramycin treatment and gestational age on maturation of *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity in pregnant women. **Clinical and Vaccine Immunology**, Estados Unidos, v. 14, n. 3; p. 239-243, March, 2007.

LESCANO, S. A.; AMATO-NETO, V.; CHIEFFI, P. P.; BEZERRA, R. C.; GAKIYA, E.; FERREIRA, C. S.; BRAZ, L. M. Evaluation of the efficacy of azithromycin and pyrimethamine, for treatment of experimental infection of mice with *Toxoplasma gondii* cystogenic strain. **Revista Sociedade Medicina Tropical**, Brasil, v. 37, n. 6, p. 460-462, Nov, 2004.

LERICHE, M. A.; DUBREMETZ, J. F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacule after host-cell invasion. **Parasitology**, England, v. 76, n. 6, p. 559-562, 1990.

LIN-ZHUAN, W.; CHUN-YAN, M.; YI-GUANG, W.; JIANLU, D.; JING-YAN, L.; HUAN-ZHANG, X. Deletion of Spiramycin 3-O-Acyltransferase Gene from *Streptomyces spiramyceticus* F21 Resulting in the Production of Spiramycin I as Major Component. **Chinese Journal of Biotechnology**, Estados Unidos, v. 23, n.1, p. 612-617, 2007.

LIN, J.; YAN, M.; SAHIN, O.; PEREIRA, S.; CHANG, Y. J.; ZHANG, Q. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Estados Unidos, v. 51, n.5, p. 1678-1686, May, 2007.

LONGO, M.; ZANONCELLI, S.; TORRE, P. D.; ROSA, F.; GIUSTI, A.; COLOMBO, P.; BRUGHERA, M.; MAZUÉ, G.; OLLIARO, P. Investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin using the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX). **Reproductive Toxicology**, Estados Unidos, v. 25, n.4, p. 433-441, Aug, 2008.

LOPES, C. D. **Azitromicina inibe a infecção por *Toxoplasma gondii* em tecidos oculares reduz parasitismo na infecção congênita e adquirida em modelo experimental de *Calomys callosus***. 2008. Dissertação mestrado-Curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

LYCKE, E.; CARBERG, K.; NORRBY, R. Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host-cell: function of the penetration enhancing factor *Toxoplasma*. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v. 11, n. 4, p. 853-861, apr, 1975.

LYNFIELD, R.; HSU, H. W.; GUERINA, N. G. Screening methods for congenital toxoplasmosis and risk of disease. **The Lancet**, England, v. 353, n. 9168, p. 1899-1900, Jun, 1999.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 198-201, May, 2002.

MADALENA, J. **Determinação de IgE específica e total por ELISA em amostras de soro na estrogiloidíase humana**. 1999. Monografia (conclusão de curso de Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Uberlândia, Orientador: Julia M. Costa-Cruz.

MARTINS-DUARTE, E. S.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, v. 58, n.1, p. 59-65, Jul. 2006.

McCABE, R.E.; LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Effect of murine interferon-gamma on murine toxoplasmosis. **Jounal Infectious Disease**, United States, v.150, p. 961-2, Dec, 1984.

MELLO, D. A . Note on greeding of *Calomys expulsus*, Lund, 1841 (Rodentia, cricetidae) under laboratory condition. **Revista Brasileira Pesquisa Médica biológica**, Brasil, v. 10, n. 2, 1977.

MENZIES, F. M.; HENRIQUEZ, F. L.; ROBERTS, C. W. Immunological control of congenital toxoplasmosis in the murine model. **Immunology Letters**, Netherlands, v. 115, p. 83-89, Nov, 2008.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, England, v.39, n. 1, p. 23-39, jan, 2009.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, London, v. 363, p. 1965-1976, Jun, 2004.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**, 11^a ed. Atheneu, São Paulo, 2005, p. 147-56.

NICOLLE, C.; MANCEUX, L. Sur le infection à corps de Leishman (ou organismes voifins) du *gondii*. **Compte Rend Academy Science Paris**, França, v. 147, n.2, p. 763-766, 1908.

OLIVEIRA, T. C. **Avaliação dos efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato total de *Artemisia annua* L. no controle da infecção aguda por *Toxoplasma gondii*.** 2007. Dissertação mestrado-Curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, N. M.; SANTOS, A. A. D.; SOUZA, M. A.; FERREIRA, G. G. L. S.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN- γ . **Placenta**, England, v. 27, p. 691-98, Jun, 2006.

OU-YANG, K.; KRUG, E. C.; MARR, J. J.; BERENS, R. L. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* by Qinghaosu and derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 34, n.10, p. 1961-1965, Oct, 1990.

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**, Brasil, v. 94, p. 103-114, Jan, 1999.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, Netherlands, v. 12, n. 3, p. 214-223, Jun, 2007.

PETROPOULOS, A. D.; KOUVELA, E. C.; STAROSTA, A. L.; WILSON, D. N.; DINOS, G. P.; KALPAXIS, D. L. Time-resolved binding of azithromycin to *Escherichia coli* ribosomes. **Journal Molecular Biology**, England, v. 385, p. 1179-1192, Jan, 2009.

PEYRON, F.; ATEBA, A. B.; WALLON, M.; KODJIKIAN, L.; BINQUET, C.; FLEURY, J.; GRAWEG, J. Congenital toxoplasmosis in twins: a report of fourteen consecutive cases and a comparison with published data. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, Estados Unidos, v. 22, n. 8, p. 695-701, Aug, 2003.

PFEFFERKORN, E. R. Cell biology of *Toxoplasma gondii*, In: Wyler, D. J. **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects**, New York: W. H. Freeman, Sep, 1990.

RATH, K.; TAXIS, K.; WALZ, G.; GLEITER, C. H.; LI, S. M.; HEID, L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annuam wormwood). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n.2, p. 128-132, Jan, 2004.

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

RETSEMA, J. F. W. Macrolides: structures and microbial targets. **International Antimicrobial Agents**, Netherlands, v. 18, n. 1, p. 3-19, 2001.

REY, L. *Toxoplasma gondii*, In: **Parasitologia: Toxoplasma gondii e a toxoplasmose**, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, cap. 25, 2001, p. 321-334.

RIBEIRO, R. D. Novos reservatórios de *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Biologia**, v.33, n.3, p.429-437, 1973.

ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/ c mice infected for the first time during pregnancy. **Parasitology**, England, v. 104, p. 19-23, Feb, 1992.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 14, n. 3, p. 476-488, Jul, 2001.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. In: Imunologia, 6^a ed. Cap. 4: **Anticorpos**, p.65-85. São Paulo: Manole, 2003.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, Estados Unidos, v. 21, p. 458-472, May, 2006.

SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, England, v. 21, n. 10, p. 476-481, Oct, 2005.

SANTANA, L. A. **Análise da eficiência da associação dos fármacos (sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico) no tratamento da toxoplasmose congênita**

experimental em *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). 2006. Monografia-Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

SARCIRON, M. E.; SACCHARIN, C.; PETAVY, A. F.; PEYRON, F. Effects of artesunate, dihydroartemisinin, and an artesunate-dihydroartemisinin combination against *Toxoplasma gondii*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.62, n.1, p.73-76, Jan. 2000.

SHI, X.; ZHANG, S.; FAWCETT, J. P.; ZHONG, D. Acid catalysed degradation of some spiramycin derivatives found in the antibiotic bitespiramycin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 36, p. 593-600, Nov, 2004.

SIBLEY, L.D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. **Science**, United States, v. 304, p. 248 – 253, Apr, 2004.

SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. B.; KRAHENBUHL, J. L. Macrophage interactions in toxoplasmosis, **Research. Immunology.**, France, v. 144, p. 38–40, Jan, 1993.

SILVA, P. Sulfonamidas e outros quimioterápicos. In: **Farmacologia**. 5º ed. Guanabara Koogan, Cap. 114, 1998, p.1021-1035.

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F. L., ALVAREZ-LEITE, J. L.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of

interferon regulatory factor1. **Infection and Immunity**; Estados Unidos, v.70, n. 2, p. 859-68, Feb, 2002.

SILVA-SEGUNDO, G. R. S. **Incidência de toxoplasmose congênita em hospitais público e privado**- Uberlândia, 2002 (Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia-MG).

SIMS, T. A.; HAY, J.; TALBOT, I. C. Host parasite relationship in the brains in mice with congenital toxoplasmosis. **Journal of Pathology**, England, v. 156, n. 3, p. 296-261, Feb, 1988.

SINAGRA, A.; LUNA, C.; ABRAHAM, D.; IANNELLA, M. C.; RIARTE, A.; KROLEWIECKI, A. J. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, Brasil, v. 40, n. 6, p. 627-630, Nov, 2007.

SINAI, A.P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. **Sub cellular Biochemistry**, England, v. 47, p. 155-64, Jul, 2008.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parasita dei conigh. Incontrato nelle lesioni anatomiche d una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Revista Academia Ciência (São Paulo)**, Brasil, v.3, n.109, p. 109-112, 1908.

STOKKERMANS , T. J.; SCHWARTZMAN, J. D.; KEENAN, K.; MORRISSETTE, N. S.; TILNEY, L. G.; ROSS, D. S. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. **Experimental Parasitology**, New York, v. 84, n. 3, p. 355-370, Dec, 1996.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, England, v. 22, p. 137-342, March, 2006.

SULLIVAN, W. J.; HAKIMI, M. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, Netherlands, v. 148, p. 109-116, Aug, 2006.

SUSUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, Estados Unidos, v. 240, n. 4851, p. 516-518, Apr, 1988.

SYROCOT (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) study group) THIÉBAUT, R.; LEPROUST, S.; CHÊNE, G.; GILBERT, R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients data. **Lancet**, England, v. 13, n. 369, p. 115-122, Jan, 2007.

TODROS, T.; VERDIGLIONE, P.; OGGÈ, G.; PALADINI, D.; VERGANI, P.; CARDAROPOLI, S. Low incidence of hypertensive disorders of pregnancy in women treated with spiramycin for *Toxoplasma* infection. **British Journal of Clinical Pharmacology**, England, v. 61, p. 336-340, Mar, 2006.

TORKILDSEN, G.; TERRENCE, P.; OBRIEN, P. Conjunctival tissue pharmacokinetic properties of topical azithromycin 1% and moxifloxacin 0.5% ophthalmic solutions: a single-dose, randomized, open-label, active-controlled trial in healthy adult volunteers. **Clinical Therapeutics**, Estados Unidos, v. 30, n.11, p.2005-2013, Nov, 2008.

WILSON, M. B.; NAKAME, P. K. **Antibody conjugated to horseradish peroxidase**. In: Knapp W, Holubar K, Wick G, eds. Immunofluorescence and related staining technique. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical; 1978. p. 215-24.

ZENNER, L; DARCY, F.; CESBRON-DELAUN, M. F.; CAPRON, A. Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of chronic infection. **Infectious Immunology**, v. 61, n. 1, p. 360-363, Jan, 1993.