

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

A Transmissão Congênita da Toxoplasmose em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) é Dependente do Tempo de Infecção Materna

Bellisa de Freitas Barbosa

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

Uberlândia – MG
Novembro - 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

A Transmissão Congênita da Toxoplasmose em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) é Dependente do Tempo de Infecção Materna

Bellisa de Freitas Barbosa

Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro

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

Uberlândia – MG
Novembro - 2004

Aos meus pais, irmã e tia:

Maria de Freitas Barbosa,
João Vieira Barbosa,
Julice de Freitas Barbosa e
Abadia Vieira Barbosa,

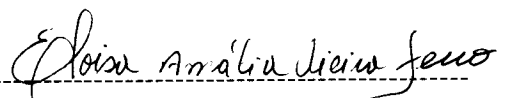
Ofereço-lhes esta conquista árdua, porém grandiosa, de meu trabalho e vos agradeço por tanta
paciência e motivação a mim concedidas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

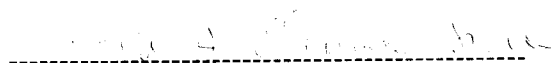
A Transmissão Congênita da Toxoplasmose em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) é Dependente do Tempo de Infecção Materna

Bellisa de Freitas Barbosa

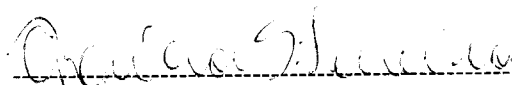
Aprovada pela Banca Examinadora em 22/11/2004 Nota 8,0



Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro
Nato da banca examinada



Ms. Deise Aparecida de Oliveira Silva
Examinadora



Ms. Gabriela Lícia Santos Ferreira
Examinadora

Uberlândia, 23 de novembro de 2004

Agradecimento especial

A Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro,

**Pelo trabalho, paciência, dedicação e competência no
exercício de sua profissão. Obrigada pelo
companheirismo e incentivo dados em todos os
momentos dessa caminhada. Grande parte dessa
conquista deve-se a você: muito obrigada!**

Agradecimentos

- À Eloísa, por sua dedicação e competência;
- Ao Anderson e Rui Silva, pelo auxílio no processamento do material para microscopia óptica;
- Ao Sr. Hégio Heinisch Werneck, pela produção das navalhas e por digitar a senha do computador quando dele precisei;
- À Deise Aparecida Oliveira Silva, pela ajuda no teste ELISA e no manuscrito deste trabalho;
- À Gabriela Lícia Santos Ferreira, pela sua importante opinião enquanto escrevia este trabalho;
- Ao Márcio José Ferreira e Angélica Gomes Oliveira, por tantos auxílios, momentos de descontração e amizade.

Resumo

A toxoplasmose é uma infecção que geralmente cursa de forma assintomática. Existem duas situações potencialmente severas da doença: em pacientes imunocomprometidos e durante a primo-infecção em gestantes. Trabalhou-se com *Calomys callosus* objetivando estabelecer o perfil de transmissão vertical desta parasitose nesta espécie de roedor. Sacrificou-se doze fêmeas inoculadas com a cepa ME-49 em diferentes períodos pós-acasalamento. Placentas e embriões foram coletados para análises morfológica e imunohistoquímica. Amostras de soros foram também analisadas pelo teste ELISA. A maioria dos animais foi soropositivo no ELISA, mas a presença de parasitos foi observada em placentas e embriões de fêmeas com uma média de 25 e 50 dias de infecção, mas não com cerca de 60 dias de infecção. Portanto, a toxoplasmose congênita não ocorre com cerca de sessenta dias de infecção materna, demonstrando um período de aquisição de resistência à toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, *Calomys callosus* e transmissão congênita.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Interação Parasito–Hospedeiro.....	01
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	03
1.3. Ciclo Biológico.....	06
1.4. Cepas de <i>T. gondii</i>	09
1.5. A Toxoplasmose.....	10
1.5.1. A Doença em Pacientes Imunocomprometidos.....	10
1.5.2. Toxoplasmose Congênita.....	11
1.5.3. Toxoplasmose Ocular.....	13
1.5.4. Prevenção.....	14
1.5.5. A Terapêutica.....	15
1.6. A Resposta Imunológica dos Hospedeiros.....	16
1.7. Diagnóstico.....	20
1.8. O Modelo Experimental <i>Calomys callosus</i>	21
1.8.1. A Placenta e a Transmissão Congênita de <i>T. gondii</i> em <i>C. callosus</i>	22
1.9. Objetivos.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Cepa de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
2.2. Manutenção da Cepa	25
2.3. Animais Receptores de Cistos.....	26
2.4. Grupos Experimentais.....	26
2.5. Sangria.....	28
2.6. Sacrifício e Coleta do Material.....	28
2.7. Preparação do Laminário Histológico.....	28
2.8. Análise Imunohistoquímica ao Microscópio de Luz.....	29
2.9. Testes Imunoenzimáticos: ELISA Clássico e ELISA Avidéz.....	30
2.9.1. ELISA (IE) Clássico.....	30
2.9.2. ELISA Avidéz.....	31
3. RESULTADOS.....	33

3.1. Placenta de <i>Calomys callosus</i>	33
3.2. Transmissão Congênita em Animais do Grupo 1.....	34
3.2.1. Análise Morfológica ao Microscópio de Luz.....	34
3.2.2. Análise Imunohistoquímica ao Microscópio de Luz.....	35
3.2.3. Teste Imunoenzimático ELISA Clássico e ELISA Aidez.....	35
3.3. Transmissão Congênita em Animais do Grupo 2.....	36
3.3.1. Análise Morfológica ao Microscópio de Luz.....	36
3.3.2. Análise Imunohistoquímica ao Microscópio de Luz.....	36
3.3.3. Teste Imunoenzimático ELISA Clássico e ELISA Aidez.....	36
3.4. Transmissão Congênita em Animais do Grupo 3.....	37
3.4.1. Análise Morfológica ao Microscópio de Luz.....	37
3.4.2. Análise Imunohistoquímica ao Microscópio de Luz.....	37
3.4.3. Teste Imunoenzimático ELISA Clássico e ELISA Aidez.....	37
4. DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÃO.....	44
6. GRÁFICOS.....	46
7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

I – INTRODUÇÃO

Interação Parasito – Hospedeiro

Os seres vivos mantêm uma grande inter-relação. Pode-se dizer que nenhum organismo animal ou vegetal consegue sobreviver sem alguma relação com o outro. Convém afirmar que esta interdependência vigente na natureza não é estática, ou seja, cada ser vivo está em um processo lento e contínuo de adaptação e, a este mecanismo, dá-se o nome de Evolução. Com o processo evolutivo, alguns organismos mantiveram associações que poderiam facilitar a aquisição de alimentos ou proteção. Estas associações abrangem, atualmente, desde a simbiose e o mutualismo até o predatismo e o parasitismo. O parasitismo certamente ocorreu com um dos organismos da associação se sentindo mais beneficiado que o outro, tanto no aspecto nutritivo quanto no aspecto de proteção. Com o decorrer do tempo, este beneficiamento foi se tornando mais determinante até que adaptações morfológicas, biológicas e fisiológicas apareceram. Portanto, o parasitismo foi altamente marcado pelas adaptações dos organismos envolvidos, o que conceitua a coevolução (NEVES et al., 2003).

Existe um grau de parasitismo que permite uma classificação. Há aqueles organismos cuja sobrevivência não depende de outros, são os denominados não parasitos; há aqueles cuja sobrevivência depende de alguns fatores ou substâncias presentes em outros organismos e, por fim, há aqueles cuja dependência é total, não sobrevivendo na ausência de seus hospedeiros. Dessa maneira, o parasitismo é “toda relação ecológica, desenvolvida entre indivíduos de espécies diferentes, em que se observa, além da associação íntima e duradoura, uma dependência metabólica de grau variável” (REY, 2001).

Nesse contexto, o parasito é capaz de retirar do organismo parasitado os recursos necessários à sua sobrevivência. Ele pode ter uma ação externa (ectoparasitismo), uma vez que obtém o oxigênio diretamente do meio ambiente, como a *Tunga penetrans*, o corriqueiro bicho de pé, que parasita a pele de suínos e humanos. E, também, pode ter uma ação interna, endoparasitismo, no qual o parasito se aloja nos tecidos e cavidades naturais do organismo hospedeiro (REY, 2001).

A distribuição geográfica de parasitos varia de acordo com as condições ambientais como temperatura, umidade e altitude, além do tamanho da população hospedeira disponível e de seus hábitos. Assim, os parasitos vivem em todos os ambientes favoráveis à sua sobrevivência, de acordo com a adaptação de cada grupo. Mas nenhum grupo é tão especializado quanto os parasitos intracelulares obrigatórios. Muitos destes parasitos intracelulares são protozoários, que conseguem atravessar as barreiras defensivas de seus hospedeiros, assegurando sua fonte de nutrição. Dentre estes grupos de protozoários, estão os parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa, graças à presença do complexo apical, que permite a entrada efetiva na célula hospedeira (REY, 2001).

Toxoplasma gondii

A espécie *Toxoplasma gondii* foi descrita, no mesmo ano, em dois trabalhos diferentes. Splendore (1908) a descreveu em coelhos, no Instituto Biológico de São Paulo, e Nicolle e Manceux (1908) no roedor africano *Ctenodactylus gondii*, no Instituto Pasteur de Tunis.

T. gondii é pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina e família Sarcocystidae. É um protozoário cosmopolita e parasito intracelular obrigatório, capaz de infectar um amplo espectro de hospedeiros.

Quanto à sua organização e ultra-estrutura, *T. gondii* possui uma forma alongada com as extremidades arqueadas, lembrando o formato de uma banana. Certas vezes, apresenta-se oval, indicando o início de um processo de divisão celular (REY, 2001). Há presença de um núcleo, de organelas típicas de células eucariontes e de película externa que consiste de três membranas: a membrana plasmática propriamente dita, que é contínua por natureza, e mais duas membranas justapostas interrompidas por fenestrações, principalmente no pólo anterior do parasito.

A região anterior do parasito é caracterizada pela presença do complexo ou aparelho apical e pelo conóide. O complexo apical constitui em uma prega localizada na membrana plasmática do parasito, delimitando uma depressão central. O conóide é uma estrutura em forma de cone oco, formada por três anéis de microtúbulos. Destes três anéis, dois estão dispostos na própria região apical e o terceiro está localizado mais posteriormente, sendo conhecido como anel polar. Existem de seis a oito microtúbulos que se cruzam obliquamente entre o anel apical inferior e o anel polar. E, do anel polar, partem vinte e dois microtúbulos que se dispõem espiralmente sob o complexo da membrana interna até a região posterior do parasito (FERRO, 2000).

No interior do conóide, estão presentes as micronemas e roptrias. As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas. São pequenas e alongadas, que se orientam ao longo

do principal eixo do protozoário, na região apical, logo abaixo do complexo da membrana interna (CARRUTHERS, 2002). Uma variedade de proteínas tem sido relatada como aderentes à célula do hospedeiro, como a família das trombospondinas, bem caracterizadas no gênero *Plasmodium* (SIBLEY, 2004).

O conteúdo protéico das micronemas é descarregado, primeiramente, durante o contato inicial do pólo apical do parasito com a superfície da célula hospedeira. Após a liberação, algumas proteínas permanecem associadas à superfície apical de *T. gondii*, no intuito de se ligarem aos receptores existentes na membrana celular do hospedeiro. As proteínas agem na ligação e penetração celulares (CARRUTHERS, 2002).

Estudos recentes demonstram que a atividade secretora das micronemas depende da concentração intracelular de cálcio (CARRUTHERS; SIBLEY, 1999). O parasito é capaz de se suprir de cálcio para estimular a descarga das micronemas. Para isso, possui duas proteínas quinases dependentes de cálcio, TgCDPK1 e TgCDPK2, que regulam a sua motilidade e a sua ligação com as células hospedeiras. Assim, tais proteínas quinases de *T. gondii* regulariam, de forma direta ou indireta, a atividade secretora das micronemas (KIESCHNICK et al., 2001).

Já foram descritas onze proteínas derivadas das micronemas e, pelo menos, mais nove estão em processo de identificação. A proteína MIC-1 está associada a MIC-4 e MIC-6, uma vez que possuem propriedades de adesão. É interessante notar que MIC-1 é uma lectina específica para lactose, portanto, se liga aos receptores de lactose na membrana do hospedeiro. MIC-3 e MIC-8 também formam um complexo aderente e, similarmente a MIC-1, MIC-3 é uma lectina capaz de reconhecer as glicoproteínas de superfície do hospedeiro como receptores (CARRUTHERS, 2002).

A molécula MIC-2, em *T. gondii*, é expressa em todos os estágios invasivos do parasito. Sua ligação com moléculas de heparina e interações com as glicosaminoglicanas são de

importância elevada para o reconhecimento da célula hospedeira pelo protozoário (SIBLEY, 2004).

No entanto, esta molécula MIC-2 está associada a uma outra proteína acessória, M2AP. O complexo formado é liberado na superfície de *T. gondii*, que se engaja nos receptores das células hospedeiras. Após a secreção, este complexo é translocado para o pólo posterior do parasito, fato que requer auxílio de seus microfilamentos de actina. E, em seguida, ocorre a liberação do complexo pela célula por proteólise. Portanto, pode-se afirmar que MIC-2 / M2AP participa diretamente da adesão e invasão de *T. gondii* nas células do hospedeiro (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004).

As roptrias permanecem num número de oito a dez, constituindo-se por formações membranosas em forma de clava, de extremidades dilatadas. Apresentam funções associadas com a penetração do parasito na célula hospedeira, através da liberação de enzimas proteolíticas como a ROP-1 ou PEF (fator de incremento de penetração), de 70 kDa (FERRO, 2000; LYCKE et al., 1975). As roptrias também liberam seu conteúdo no interior do citoplasma da célula hospedeira, cujas proteínas agem na biogênese e na associação do vacúolo parasitóforo, mimetizando uma possível organela do hospedeiro (CARRUTHERS, 2002).

Além das roptrias e micronemas, chama a atenção, no citoplasma destes parasitos, estruturas envoltas por membrana e de conteúdo elétron-denso. Tais estruturas denominam-se grânulos densos e contêm uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares. Uma das funções destes grânulos densos é a liberação destas glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, permitindo, além da obtenção de nutrientes do hospedeiro, uma manutenção do parasito no mesmo (CARRUTHERS, 2002).

O mecanismo de invasão de *Toxoplasma* é bastante diferente do processo de entrada de outros microorganismos intracelulares, como vírus e algumas bactérias, que requerem a

participação da célula hospedeira para que ocorra a entrada. *T. gondii* penetra ativamente na célula através de um processo dependente de sua actina e miosina, além do conteúdo protéico liberado pelas roptrias e micronemas (CARRUTHERS, 2002).

A invasão celular de *Toxoplasma* parece ser um processo rápido, levando cerca de 15 a 20 segundos, e inclui as seguintes etapas: reconhecimento, adesão, penetração e mecanismo de defesa. As fases de reconhecimento e adesão à célula hospedeira envolvem receptores para fibronectina e laminina em ambas as células, além da atividade oriunda das moléculas adesivas das micronemas. Em seguida, ocorre a penetração propriamente dita do parasito na célula hospedeira, com o auxílio das enzimas proteolíticas oriundas das roptrias e micronemas, contando ainda com movimentos de rotação, extrusão e retração do complexo apical. O mecanismo de defesa refere-se à ação dos grânulos densos, cujas glicoproteínas impedem a fusão de lisossomos no vacúolo parasitóforo, garantindo a permanência do parasito no organismo hospedeiro (CARRUTHERS, 2002; FERRO, 2000).

Ciclo Biológico

T. gondii possui três formas evolutivas conhecidas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas.

Os taquizoítas representam a multiplicação rápida do parasito na célula hospedeira, com a formação de pseudocistos, que são os vacúolos parasitóforos. Eles medem de 2 a 4µm de largura e de 4 a 8µm de comprimento e a sua replicação pode conduzir à morte celular e posterior invasão de células adjacentes (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Ultra-estruturalmente apresentam um núcleo central, uma película externa, anéis apicais, roptrias, micronemas, conóide, mitocôndrias, retículo endoplasmático granular e agranular, grânulos densos, complexo

de Golgi, ribossomos e grânulos de amilopectina, mas estes últimos não estão necessariamente presentes.

Os bradizoítas representam a multiplicação lenta do parasito na célula hospedeira, culminando com a formação de verdadeiros cistos teciduais. Um cisto tecidual pode abrigar de centenas a milhares de bradizoítas e pode estar presente em qualquer tecido do hospedeiro. Porém, é mais freqüente nos músculos esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Morfologicamente, poucas são as diferenças entre bradizoítas e taquizoítas. Ao contrário dos taquizoítas, os bradizoítas têm um núcleo situado mais posteriormente, numerosos grânulos contendo amilopectina e são mais resistentes à enzimas proteolíticas (JACOBS et al., 1960).

No interior dos cistos, os bradizoítas dividem-se lentamente por endodiogenia, uma especializada forma de divisão na qual duas células-filhas formam-se no interior da célula mãe, mantendo-se, por algum tempo, unidas pela extremidade posterior (FERRO, 2000; REY, 2001).

Já os esporozoítas, que possuem um maior número de micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina que os taquizoítas, estão contidos no interior de oocistos, que são liberados juntamente com as fezes de felinos.

Apenas os gêneros *Felix* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, ou seja, desenvolvem o ciclo sexuado no epitélio intestinal, liberando oocistos no meio ambiente. Esta liberação de oocistos pode durar, geralmente, cerca de um mês após a infecção, porém é possível detectar oocistos nas fezes de gatos até um ano pós-infecção (REY, 2001). Quanto aos hospedeiros intermediários, o protozoário pode infectar as células de mamíferos e aves, exceto hemáceas, por serem anucleadas, já que estes animais desenvolvem apenas um ciclo tissular assexuado.

O ciclo de vida de *T. gondii* pode ser assim resumido: após a ingestão de cistos teciduais por gatos, a parede do cisto é rompida por enzimas proteolíticas gástricas e bradizoítas são liberados, penetrando nas mucosas do estômago e/ou do intestino delgado. No epitélio intestinal, o parasito se multiplica por esquizogonia, divisão nuclear sem a concomitante divisão citoplasmática, formando os esquizontes. Os núcleos formados migram para a região cortical do esquizonte e a membrana plasmática vai, aos poucos, individualizando-os. Este processo dá origem aos merozoítas que, por sua vez, iniciam a formação dos gametas. Ocorrida a fertilização no epitélio intestinal, uma parede de cinco camadas é formada ao redor do zigoto, originando os oocistos. Eles caem na luz intestinal e são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes, medindo cerca de 10 a 12µm. O amadurecimento destas estruturas dá-se através da esporulação, mecanismo que ocorre de 1 a 5 dias pós-eliminação (DUBEY et al., 1998).

A esporulação segue da seguinte forma: o núcleo do oocisto divide-se duas vezes formando quatro núcleos, que migram para a região cortical; ocorre uma divisão citoplasmática separando cada dois núcleos e formando dois esporoblastos; o alongamento destes esporoblastos bem como o espessamento da parede que os separam formam dois esporocistos; em seguida ocorre divisão dos núcleos formando quatro esporozoários dentro de cada esporocisto (DUBEY et al., 1998).

Quanto ao processo de infecção, o homem pode adquirir a toxoplasmose de seis maneiras: (1) através da ingestão de cistos presentes em carne crua ou mal cozida; (2) por ingestão de oocistos em frutas, verduras ou águas contaminadas por fezes de gatos ou pela sua movimentação através de vetores mecânicos (moscas, baratas, ratos); (3) transmissão transplacentária; (4) contato com taquizoítas presentes na saliva, leite e espermatozoides; (5) através de órgãos transplantados; (6) por acidentes laboratoriais (FERRO, 2000).

O leite e seus derivados podem ser uma importante fonte de infecção humana, uma vez que cistos resistem no leite após este ser refrigerado a 4°C, durante vinte dias. Além disso, os cistos também resistem ao processo de fabricação do queijo, permanecendo infectantes após um período de dez dias de conservação, nas mesmas condições do leite (HIRAMOTO et al., 2001).

Cepas de *T. gondii*

Já foram descritas três linhagens de *T. gondii*, tipos I, II e III, dentre as quais se distribuem diferentes cepas do parasito, que se diferem principalmente quanto ao nível de virulência e quanto ao padrão epidemiológico de ocorrência no hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

No entanto, estudos relatam um aumento no número de exemplares de cepas, que foram divididas em duas classes gerais: cepas cujo genótipo é claramente semelhante aos três tipos dominantes (I, II e III); e cepas ditas “exóticas”, as quais seus genótipos diferem das três linhagens clonais existentes (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

As cepas do tipo I causam uma rápida mortalidade, como as cepas RH, CAST e VEL e a animal C56. Em contrapartida, as cepas do tipo II podem ocasionar mortalidade, a qual depende da carga parasitária presente no hospedeiro e da resposta imunológica do mesmo. No entanto, a cepa tipo II ME-49 causa encefalite toxoplásmica severa em camundongos CBA/Ca (ARAÚJO; SLIFER, 2003). As cepas do tipo III são relativamente brandas, não sendo altamente virulentas nos camundongos.

A Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário coccídeo *Toxoplasma gondii*. É uma doença que causa problemas para a saúde pública, pois desenvolve um quadro preocupante em pacientes imunodeprimidos e em crianças infectadas congenitamente. Excluindo tais ocasiões, a doença geralmente cursa de forma assintomática ou benigna.

O curso da doença se dá em dois estágios: fase aguda e fase crônica. Na fase aguda, há o predomínio de taquizoítas, que se multiplicam rapidamente e invadem novas células. Algumas manifestações clínicas podem ocorrer como febre, dor de garganta e linfadenopatia. Já na fase crônica, há o predomínio de cistos teciduais contendo bradizoítas no seu interior, e uma resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito torna-se mais eficaz, pois conta com a imunidade adaptativa.

• A Doença em Pacientes Imunocomprometidos

Este grupo é constituído por HIV positivos, pacientes em tratamento quimioterápico, indivíduos transplantados ou indivíduos com doenças auto-imunes. Nestas pessoas, a manifestação da doença quase sempre ocorre como resultado da reativação de cistos pré-existent. Neste contexto, os bradizoítas voltam ao estágio de taquizoítas, multiplicando-se ligeiramente, podendo levar o paciente a óbito.

Estudos revelam que cepas do tipo II estão mais associadas à doença humana, especialmente nos pacientes imunodeprimidos HIV positivos. Uma análise feita na França indicou que, 34 dos 45 pacientes aidéticos com toxoplasmose, possuem alguma cepa do tipo II, e o restante contém cepas dos tipos I e III (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

O sistema nervoso central é o local preferencialmente afetado pela infecção. O envolvimento do tecido nervoso é detectado em 60 a 90% das autópsias de pacientes HIV

positivos no Brasil. A lesão clínica mais usual, que era raramente vista antes da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), é a encefalite toxoplásmica (PASSOS et al., 2000). As manifestações clínicas incluem mudanças no status mental, deficiências motoras focais, distúrbios nos nervos cranianos, anormalidades sensoriais, sinais cerebelares e retardamento mental. Manifestações na meninge são raras. A pneumonite é observada, freqüentemente, em pacientes transplantados, porém, também se faz presente em indivíduos HIV positivos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Apesar disso, há relatos de toxoplasmose pulmonar e cerebral severas em pacientes imunocompetentes, causando insuficiência respiratória aguda e lesões neurais, mesmo não se detectando fatores imunodepressores nestes indivíduos (CAL et al., 2003; SILVA et al., 2001).

- Toxoplasmose Congênita

A forma congênita da toxoplasmose representa a passagem transplacentária do parasito durante a gestação. No entanto, a transmissão congênita da doença não é obrigatória, equivalendo cerca de 20 a 50% dos casos de infecção aguda primo-materna humana (JONES et al., 2001). A transmissão materno-fetal também se faz presente nos outros mamíferos, até mesmo em renas, que vivem em locais de clima frio desfavoráveis à sobrevivência de *T. gondii* (DUBEY et al., 2002).

Como já mencionado, a toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes é geralmente assintomática ou branda, podendo causar febre, linfadenopatia e fadiga, dentre outras manifestações. Tais sintomas permanecem por algumas semanas ou meses, desaparecendo posteriormente, sem a necessidade de um tratamento específico. Porém, indivíduos infectados congenitamente tornaram-se um problema sério de saúde pública. Nos Estados Unidos, cerca de sete bilhões são gastos por ano no tratamento da toxoplasmose congênita (JONES et al., 2001).

Algumas alterações e sinais fetais caracterizam uma infecção congênita, como dilatação ventricular, hepatomegalia, microcefalia, hidrocefalia, calcificação intracranial, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardamento mental causado por encefalite e anemia. Neste contexto, a clássica tríade, composta por hidrocefalia, calcificação intracranial e coriorretinite, é bastante usada no diagnóstico de doença fetal. No entanto, tais sinais descritos podem também ser consequência de infecções congênitas causadas por outros patógenos como o citomegalovírus, vírus do herpes, rubéola e sífilis (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Apesar disso, Neto e colaboradores (1982) consideram a Tétrade de Sabin lema orientador bastante relevante no diagnóstico da toxoplasmose, sendo composta, além das três manifestações acima descritas, pelo retardamento mental. No entanto, o feto pode apenas desenvolver um quadro sub-agudo a crônico, podendo facilmente ser tratado, sem deixar alterações congênicas.

O taquizoíta de *Toxoplasma* é a forma responsável pela passagem transplacentária e, na espécie humana, a transmissão congênita se dá na fase aguda da doença. As cepas dos tipos I e II são as mais relatadas em se tratando de doença congênita (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Mulheres infectadas antes da concepção geralmente não transmitem o parasito para a sua prole, porém, quando infectadas durante a gestação, podem fazê-lo. O risco de transmissão congênita é menor se a infecção materna ocorrer no primeiro trimestre de gestação, no entanto, o comprometimento fetal é mais severo, podendo chegar ao aborto. Em contrapartida, o risco de transmissão congênita se torna maior quando a infecção materna se dá no terceiro trimestre de gestação, mas o comprometimento fetal é menor nesse caso (JONES et al., 2001; MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Mulheres gestantes com uma infecção reativada, devido a algum fator imunodepressor, também podem transmitir a toxoplasmose.

No entanto, Chemla e colaboradores (2002) relataram dois casos não usuais de doença congênita. Um deles ocorrendo com uma infecção materna pré-concepção, isto é, houve a

transmissão materno-fetal de *T. gondii* mesmo após a infecção materna ter ocorrido em curtos períodos que antecederam a concepção. E, o outro caso ocorreu após uma infecção materna no fim da gestação, sem uma soroconversão maternal detectável. Embora uma infecção materna antes da concepção normalmente exclua o risco de infecção fetal, pode ocorrer transmissão congênita quando a soroconversão materna ocorre em poucas semanas que antecedem a concepção.

Dessa forma, o risco de toxoplasmose congênita pode ser realmente confirmado quando o diagnóstico da soroconversão materna e do período exato de gestação no qual ocorreu a infecção são confirmados, e isto é extremamente importante para conduzir a uma terapêutica eficiente. Assim, sugere-se um monitoramento sorológico materno antes da concepção e um mês após o parto em todas as mulheres que permaneceram negativas para a toxoplasmose durante todo o período gestacional (CHELMA et al., 2002).

- Toxoplasmose Ocular

A doença ocular, como uma consequência da forma congênita ou da forma adquirida, também é bastante comum, se manifestando por uma severa lesão na retina com uma intensa reação inflamatória local. A este processo dá-se o nome de coriorretinite ou retinocoroidite e há a formação de uma visível mancha branca (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). As cepas mais virulentas nos humanos relacionadas à doença ocular são as do tipo I (BOOTHROYD; GRIGG, 2002), embora casos de toxoplasmose ocular severa têm sido descritos com cepas exóticas, mais raras, do tipo IV.

Quando a toxoplasmose ocular congênita está presente na infância, a infecção pode interferir no desenvolvimento normal do olho. E, a sua manifestação em adultos, pode ser

consequência de uma reativação da infecção congênita, podendo estar se manifestando na segunda ou terceira década de vida (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

Pereira e colaboradores (1999), ao analisarem a toxoplasmose ocular em *Calomys callosus*, um roedor bastante encontrado no cerrado brasileiro, verificaram a presença de cistos e taquizoítas de *T. gondii* e a presença de células inflamatórias na retina e demais tecidos próximos. Houve 40% de lesão ocular nos fetos infectados, sendo que 16% tinham a retina comprometida e 4% deles tiveram seus nervos ópticos e lentes afetadas. Assim, pode-se afirmar que *C. callosus* é um bom modelo de estudo para a toxoplasmose ocular congênita.

• Prevenção

No intuito de prevenir a toxoplasmose em mulheres gestantes para evitar a forma congênita, várias recomendações são válidas. Alimentos, como carnes, frutas e verduras, devem ser bem cozidos e lavados, uma vez que estes podem estar infectados por cistos teciduais, no caso da carne, ou contaminados por oocistos veiculados por vetores mecânicos, no caso das frutas, verduras ou até a água. Luvas devem ser usadas caso haja a necessidade de manusear jardins, hortas ou areia, locais propícios à presença de gatos.

O risco de se adquirir o protozoário não é, meramente, devido ao gato, mas à possível exposição as suas fezes, que podem conter oocistos. Gatos domésticos, que não caçam ou que não se alimentam de carne crua ou mal cozida, não são fontes de risco para a disseminação da toxoplasmose. Não há nenhum relato de material fecal encontrado na pele de gatos graças aos seus hábitos, uma vez que enterram as suas fezes no solo, não entrando em contato com as mesmas. Dessa forma, o risco de se adquirir o parasito, pelo contato com a pele de gatos, é quase inexistente (JONES et al., 2001).

Os felinos podem não desenvolver anticorpos contra *T. gondii* durante o período em que estão liberando oocistos. Sendo assim, um gato, cujo teste sorológico resulte positivo, provavelmente, já liberou seus oocistos anteriormente e, portanto, exibe um menor risco de transmissão que um gato cuja sorologia seja negativa. No entanto, existem relatos de liberação de oocistos após um ano de infecção por *T. gondii* (JONES et al., 2001; REY, 2001).

- A Terapêutica

Os indivíduos imunocompetentes não recebem um tratamento específico, principalmente em pacientes assintomáticos, a não ser que os sintomas sejam severos ou persistentes.

A terapêutica clássica contra a toxoplasmose é a combinação de sulfadiazina e pirimetamina. No entanto, estas drogas não atuam contra a forma encistada do parasito, sendo prescritas em situações específicas (BRAZ et al., 1999). A associação com ácido folínico também é comum no tratamento da doença aguda, já que a pirimetamina destrói o ácido fólico tanto produzido pelo parasito quanto pelo hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Estudos utilizando camundongos BALB/c infectados com a cepa RH de *T. gondii* verificaram uma eficiência significativa no tratamento da toxoplasmose, a medida em que houve a associação dos fármacos azitromicina e pirimetamina. O tratamento da toxoplasmose de pacientes HIV positivos indicou ação inicial favorável, porém houve altos índices de recaídas (BRAZ et al., 1999).

A espiramicina é indicada para gestantes com confirmada infecção aguda por *T. gondii*. Caso a infecção fetal seja confirmada, pirimetamina e sulfadiazina são acrescentadas, uma vez que a espiramicina não atravessa a barreira placentária, fato que diminui significativamente as seqüelas do recém-nascido (JONES et al., 2001; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A pirimetamina e a sulfadiazina atuam contra o parasito com uma eficiência oito vezes maior do que se fossem administradas isoladamente. A superdosagem de pirimetamina em crianças pode resultar em vômitos, tremores, convulsões e depressão da medula óssea, uma vez que a pirimetamina inibe a dihidrofolato redutase, importante na síntese do ácido fólico (DINIZ; VAZ, 2003).

Portanto, a combinação terapêutica recomendada para a toxoplasmose congênita no recém-nascido é o uso de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico. Corticosteróides têm sido recomendados em casos de acometimento do sistema nervoso central e coriorretinite (DINIZ; VAZ, 2003).

A Resposta Imunológica dos Hospedeiros

Como *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células é considerada a mais relevante no mecanismo de regulação da infecção. Deste contexto, fazem parte os linfócitos T, as células apresentadoras de antígenos (APC) como os macrófagos e as células “Natural Killer” (NK).

Os macrófagos, quando ativados, produzem óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de oxigênio (ROI), lhes permitindo uma ação tóxica contra o parasito, além de apenas apresentá-lo aos linfócitos.

Os linfócitos TCD4⁺ pertencem a uma população de células T “helper”, as quais na presença de alérgenos ou antígenos de helmintos, diferenciam-se na subpopulação de células T “helper” 2 (Th2), enquanto que, na presença de microorganismos intracelulares, tais células diferenciam-se na subpopulação Th1. Portanto, *T. gondii* estimula uma resposta imune do tipo Th1, com um perfil de citocinas Th1, como a interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ).

O papel das citocinas secretadas pelas células do sistema imune, quando ocorre a infecção por *T. gondii*, tem sido largamente estudado nos últimos anos. A IL-12 é uma citocina que tem merecido especial interesse, uma vez que o parasito é um potente estimulador da liberação de IL-12 por macrófagos (GAZZINELLI et al., 1994).

Macrófagos, na presença de *T. gondii*, produzem IL-12, que estimula as células NK e as células TCD4⁺ que, por sua vez, diferenciam-se na subpopulação Th1, produtora de IL-2 e IFN- γ . Este efeito é muito importante na sobrevivência do hospedeiro. A produção de IFN- γ por células NK também é aumentada por IL-12, sendo também essencial para a diferenciação de linfócitos Th1 (KENNEDY et al., 1994). A IL-2 é a citocina que promove a proliferação e expansão clonal dos linfócitos no local da infecção, enquanto que IFN- γ é a mais potente citocina ativadora de macrófagos.

Como mencionado, a resposta imune ao parasito é principalmente fornecida pelas citocinas do perfil Th1. Todavia, as citocinas dos linfócitos Th2, como IL-4 e IL-10, estão associadas com o aumento da susceptibilidade à infecção.

A susceptibilidade de gestantes à toxoplasmose pode ser devido às citocinas do perfil Th2, que são superexpressadas durante a gestação. Em murinos, tais citocinas estão associadas ao sucesso da implantação embrionária e à supressão de respostas inflamatórias locais. Já as citocinas do perfil Th1, pelo contrário, apresentam baixa expressão. Esse padrão típico de citocinas causa a susceptibilidade à toxoplasmose, conseqüentemente, à infecção placentária e fetal (ABOU-BACAR et al., 2004).

Abou-Bacar e colaboradores (2004), utilizando camundongos depletados de células T e B, estudaram o papel da célula NK na infecção por *Toxoplasma*. Nestes camundongos verificou-se um aumento do número de células NK, que compensou a ausência dos linfócitos, protegendo os

fetos contra o parasito. Dessa maneira, as células NK tiveram o papel principal no controle da passagem transplacentária de *T. gondii*. Esse sucesso esteve associado com a produção de IFN- γ por essas células, que é a citocina mais potente contra a toxoplasmose aguda. Baseando-se nestas informações, pode-se dizer que as células NK e o IFN- γ são extremamente importantes para reduzir a infecção congênita e materna.

Os linfócitos TCD4⁺ possuem receptores para a IL-2, já que esta citocina promove a sua proliferação. A cadeia α deste receptor denomina-se CD25 e tem sido alvo de algumas pesquisas. Analisando 592 pacientes com toxoplasmose adquirida e congênita, observou-se que a expressão de CD25 é maior naqueles indivíduos infectados pelo parasito, demonstrando uma possível forma de avaliar a imunidade celular específica através da citometria de fluxo (FATOOHI et al., 2003).

Os linfócitos TCD8⁺ também exercem um papel importante na proteção contra o parasito. São chamadas células T citotóxicas (CTL), uma vez que possuem grânulos citotóxicos, que são liberados na célula alvo, causando a sua lise. Entre estas toxinas estão a perforina e a granzima- β , que causam apoptose. Causando a lise da célula infectada, os taquizoítas ficam livres para serem destruídos por macrófagos ativados por IFN- γ (FERRO, 2000).

Linfócitos TCD8⁺ também têm uma atividade relacionada à produção de IFN- γ , contribuindo, assim como os linfócitos TCD4⁺, para o controle das infecções aguda e crônica. Portanto, linfócitos TCD8⁺ atuam contra a infecção por *T. gondii* a medida em que produzem IFN- γ e ao liberarem seus grânulos citotóxicos, que causam lise celular (FERRO, 2000).

Os mastócitos também apresentam um importante papel no que diz respeito à proteção contra *T. gondii*. Estes liberam histamina, proteases, ácido aracdônico e várias citocinas como IL-1, -3, -4, -5, -6, -8, -10, -13, -16 e TNF- α . Estas 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).

No intuito de entender melhor a interação existente entre mastócitos e parasitos de *T. gondii*, estudos foram realizados utilizando o modelo experimental *Calomys callosus*. A infecção dos mastócitos mostrou alterações morfológicas no seu contorno e espessura, além de exibirem um baixo número de grânulos citoplasmáticos, sinalizando uma alta taxa de desgranulação dessas células. Vacúolos parasitóforos no interior dos mastócitos foram observados e, mesmo em células não infectadas, seus grânulos estavam em baixo número. Esse quadro se deve à presença de antígenos secretados por *T. gondii*, que são potentes indutores da desgranulação de mastócitos na resposta inflamatória aguda (FERREIRA et al., 2004).

A imunidade induzida pela infecção adquirida antes da concepção impede o parasito de atravessar a placenta, protegendo o feto. Dessa maneira, torna-se possível bloquear a doença fetal através de uma vacinação materna antes da gestação.

Estudos realizados com camundongos BALB/c e CBA/J, utilizando a proteína de 30 kDa, SAG-1, de *T. gondii*, foram bastante promissores. A proteína SAG-1 é o principal antígeno de superfície de *T. gondii*, sendo conservada em todas as cepas, além de induzir a produção de um alto nível de anticorpos no homem. Essa proteína foi usada na vacinação desses camundongos que, após a última imunização, foram colocados para acasalar e assim analisar fetos e placentas (LETSCHER-BRU et al., 2003).

A vacinação com a proteína SAG-1 sem adjuvantes reduziu a transmissão materno-fetal do parasito em mais de 50% durante a infecção primo-materna em camundongos BALB/c, que apresentaram altos níveis de IFN- γ . Em contraste, a passagem do parasito através da placenta foi aumentada em 50% nos camundongos CBA/J. Esse aumento da transmissão congênita em

camundongos CBA/J vacinados foi associado ao aumento de IL-4 no soro destes animais, uma vez que esta interleucina induz a uma resposta imune do tipo Th2 e não Th1, responsável pela resistência do hospedeiro (LETSCHER-BRU et al., 2003).

Diagnóstico

Anticorpos IgM e IgG são fundamentais no diagnóstico da toxoplasmose. Em humanos infectados por *T. gondii*, anticorpos IgM podem ser detectados sete dias após a infecção, alcançando um título máximo em poucas semanas e declinando gradualmente. Anticorpos IgG surgem em algumas semanas após a infecção e alcançam um título máximo em seis semanas. No entanto, seu título declina gradualmente em alguns meses a anos, permanecendo baixo por toda a vida (FERRO, 2000).

Dessa forma, anticorpos IgM são típicos de casos de toxoplasmose aguda, enquanto que anticorpos IgG diagnosticam a forma crônica da parasitose.

A afinidade que determinado anticorpo possui em relação ao seu antígeno específico denomina-se avidez. Assim, a avidez de anticorpos corresponde à força com que eles se ligam aos seus antígenos específicos (ROITT et al., 2003). Portanto, anticorpos IgG estão presentes em infecções recentes, porém mostram baixa avidez. E, com a maturação da resposta imune, estes anticorpos vão adquirindo avidez crescente de modo que, em infecções tardias, encontra-se um predomínio de anticorpos IgG de alta avidez.

Como já mencionado, o diagnóstico da toxoplasmose é usualmente baseado na sorologia para detectar-se anticorpos IgM e IgG. No entanto, alguns estudos têm mostrado que a IgM, considerada predominante na fase aguda, pode ser detectada meses ou até anos após a fase aguda da doença (TAKAHASHI; ROSSI, 1997). E, no intuito de aprimorar o diagnóstico seguro da toxoplasmose, aponta-se a importância de anticorpos IgA na detecção da fase aguda.

Níveis significativos de anticorpos IgA podem ser detectados por um período mais curto, delimitando de forma mais precisa a forma aguda da infecção. O “kit” das técnicas imunoenzimáticas de captura (ELISAc) demonstra que níveis maiores que 40 unidades arbitrárias por ml (40UA/ml) para IgA correspondeu à toxoplasmose aguda. Porém, níveis menores que 40UA/ml não excluem a possibilidade de fase aguda, uma vez que tais níveis podem ser alcançados em um curto período de tempo (TAKAHASHI; ROSSI, 1997).

Portanto, pesquisas utilizando parâmetros de IgA e IgM permitiriam um diagnóstico mais preciso da toxoplasmose aguda. Além disso, Montoya e Liesenfeld (2004) apontam a importância da IgE no diagnóstico associado às outras classes de imunoglobulinas, além da presença de anticorpos produzidos no olho, que podem sinalizar para a toxoplasmose ocular.

Em certos casos, como na soroconversão durante a gestação, apenas níveis de IgG fornecem o diagnóstico da infecção. A taxa de anticorpos pode aumentar apenas no terceiro ou sexto mês, atrasando o início do tratamento, apesar de ser a soroconversão a informação mais segura quanto ao risco de toxoplasmose adquirida ou congênita (MOMBRO et al., 2003), embora, na maioria das vezes, a resposta contra os cistos teciduais ocorra precocemente durante a infecção aguda e a reatividade dos anticorpos contra os antígenos específicos seja potente (VILLAVEDRA et al., 1998).

O Modelo Experimental *Calomys callosus*

Calomys callosus é um roedor, da família Cricetidae, de ampla distribuição no Brasil Central. Apresenta importância do ponto de vista de saúde pública por ser reservatório natural de *Trypanosoma cruzi* e transmissor da Febre Hemorrágica Argentina. São animais susceptíveis a doenças infecciosas e parasitárias como esquistossomose, leishmaniose e toxoplasmose (FERRO, 2000).

A toxoplasmose congênita tem sido descrita em vários modelos experimentais. Ratos e camundongos são freqüentemente utilizados no estudo de várias doenças, incluindo a toxoplasmose. No entanto, é muito difícil induzir uma transmissão congênita em ratos; e camundongos transmitem a doença tanto na fase aguda quanto na fase crônica, diferentemente de humanos, nos quais a transmissão congênita da parasitose se dá apenas na fase aguda (FERRO et al., 2002).

Ferro e colaboradores (2002) demonstraram que *Calomys callosus*, infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, transmitem o parasito para a prole apenas na fase aguda da doença, semelhante à espécie humana, tornando-se um excelente modelo experimental de estudo desta parasitose.

Outros estudos, utilizando também como modelo experimental o roedor cricetídeo *Calomys callosus*, demonstraram seu comportamento perante a infecção por *T. gondii*. A presença de parasitos foi detectada em todas as células de seus órgãos, sendo o fígado o órgão mais afetado, seguido pelo baço, pulmão, encéfalo, intestino e rins (FAVORETO-JUNIOR et al., 1998).

- A Placenta e a Transmissão Congênita de *T. gondii* em *C. callosus*

A placenta é o órgão transitório que realiza as trocas fisiológicas, através do sangue, entre mãe e feto. Entre as principais substâncias que conseguem atravessar a barreira placentária, como o oxigênio, gás carbônico, anticorpos maternos e nutrientes, alguns patógenos também o fazem como o vírus da rubéola, bactérias e protozoários como *T. gondii*.

A placenta de *C. callosus* apresenta-se constituída por três regiões distintas: camada decidual, zona juncional e zona do labirinto. As duas primeiras regiões são de origem materna, contendo, conseqüentemente, apenas sangue materno. A camada decidual constitui-se por células

deciduais. A zona juncional é composta por células granulosas metriais, que envolvem os vasos sanguíneos maternos, além dos espongiotrofoblastos e células trofoblásticas gigantes. O labirinto é a região de trocas propriamente dita, já que se observa sangue materno extravasado e sangue fetal contido no interior de vasos sanguíneos, além das células do labirinto (FERRO, 2000).

As células trofoblásticas pertencem a uma população de células embrionárias, que estão diretamente envolvidas no processo da implantação embrionária. Em roedores, como *C. callosus*, a implantação embrionária se dá por penetração, através de mecanismos de fagocitose realizados pelos trofoblastos e alojamento do embrião no endométrio. Assim, forma-se um adequado local para nutrição do embrião e concomitante desenvolvimento. Neste contexto, as células do trofoblasto também são de importância no que diz respeito à infecção por *T. gondii*. Em *C. callosus*, a infecção destas células pelos parasitos foi relatada no início da gestação, ainda no processo de implantação embrionária. Apesar de mostrarem características de células saudáveis, vacúolos parasitóforos em seus citoplasmas foram visíveis (FERRO et al., 1999).

Na fase aguda da doença, *C. callosus* podem transmitir o parasito para a sua prole. No 13º dia de gestação e infecção materna, leucócitos do sangue materno continham vacúolos parasitóforos de *T. gondii*. No 15º dia, as células trofoblásticas gigantes da placenta tornaram-se infectadas, sendo as primeiras células placentárias a serem infectadas. As células do labirinto mostraram-se infectadas no 16º dia e espongiotrofoblastos no 19º dia de gestação e infecção. Células fetais do fígado e encéfalo foram infectadas concomitantemente às células do labirinto (FERRO et al., 2002).

Na fase crônica da doença, não se detectou transmissão congênita do parasito, uma vez que, com cerca de 100 dias após infecção materna por *T. gondii*, não se verificou a presença de parasitos nas placentas e tecidos fetais (FERRO et al., 2002).

Portanto, *C. callosus*, de maneira semelhante à espécie humana, transmite a toxoplasmose para a sua prole apenas na fase aguda da doença. Isso o torna um bom modelo de estudo experimental, no intuito de estabelecer uma possível correlação com o homem (FERRO et al., 2002).

Como é possível a passagem transplacentária de *T. gondii* mesmo após uma infecção materna que ocorra em curtos períodos que antecedem a concepção ou quando esta ocorre bem no final da gestação, e sendo *C. callosus* um bom modelo experimental para a doença humana, este estudo foi proposto para obter uma soroconversão materna que garanta a não transmissão congênita da toxoplasmose.

Portanto, idealizou-se este projeto no sentido de verificar temporalmente a aquisição de um perfil sorológico materno que garanta a não transmissão congênita da toxoplasmose em um modelo experimental. Diante do exposto, *C. callosus* mostra-se apropriado a este fim, uma vez que a transmissão congênita dessa parasitose ocorre de maneira semelhante ao observado em humanos. Assim, torna-se possível estabelecer uma correlação com a espécie humana, na medida em que se verificar a aquisição de resistência à toxoplasmose congênita em *C. callosus*.

No intuito de melhor conhecer o comportamento de *C. callosus* frente à infecção pré-concepcional por *T. gondii* e o risco de toxoplasmose congênita, objetiva-se:

1. Analisar as placentas quanto à presença de parasitos de *T. gondii*;
2. Analisar os tecidos fetais quanto à presença de *T. gondii*;
3. Analisar a sorologia dos animais;
4. Estabelecer o período de soroconversão materna que corresponda com a aquisição de resistência à toxoplasmose congênita.

II - MATERIAL E MÉTODOS

Cepa de *Toxoplasma gondii*

A cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii* foi isolada a partir de músculo de carneiro em 1965 (SUZUKI et al., 1988). Apresenta baixa virulência em camundongos e produz cistos teciduais. Pereira e colaboradores (1999) demonstraram que *Calomys callosus* são resistentes a esta cepa sendo possível investigar a transmissão vertical desta parasitose.

Manutenção da Cepa

A cepa foi mantida em encéfalos de *C. callosus* machos através do inóculo de 20 cistos de *T.gondii* (cepa ME-49) em 0,5 ml de solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS), pH 7,2 estéril e via oral.

Após um período de 30 a 45 dias, um desses animais foi sacrificado, seu crânio aberto, o encéfalo coletado e macerado com auxílio de pistilo, banhado em 1ml de PBS estéril e homogeneizado por aspiração em seringa de 5ml e agulha de 25 x 7mm. O material foi ressuspenso em 10ml de PBS estéril e submetido à centrifugação a 500g por 10 minutos (1800rpm), em temperatura ambiente, por duas vezes. Após lavagens, procedeu-se a contagem

dos cistos, pela observação ao microscópio de luz em objetiva de 10X, através da adição de uma alíquota de 30µl de suspensão colocada entre lâmina e lamínula (24 x 24 mm). Após ajustar-se a concentração de 20 cistos por animal em 0,5ml de PBS, alíquotas desta amostra foram usadas para inoculação, via oral, de doze fêmeas de *C. callosus* selecionadas para acasalamento.

Animais Receptores de Cistos

Doze fêmeas de *Calomys callosus*, com idades de 50 a 70 dias, cedidas pelo Biotério do Setor de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia, foram utilizadas para inoculação com *Toxoplasma gondii*, cepa ME-49, e acasalamento.

Os animais foram mantidos no biotério com dieta *ad libitum* de água e ração granulada, complementada com sementes de girassol, aveia e milho.

Grupos Experimentais

Intervalos de tempo foram impostos no processo de acasalamento, obtendo-se três etapas diferentes:

Grupo 1 (8 a 13 dias de infecção pré-concepção): Na primeira etapa, com uma média de 10 dias de inóculo, quatro fêmeas foram colocadas para acasalar em gaiolas na proporção de uma fêmea para cada macho.

Grupo 2 (28 a 35 dias de infecção pré-concepção): Na segunda etapa, mais quatro fêmeas, já com uma média de 30 dias de inóculo, foram colocadas em gaiolas, na mesma proporção, para acasalamento.

Grupo 3 (42 a 57 dias de infecção pré-concepção): Na terceira etapa, as quatro fêmeas restantes, já com uma média de 50 dias de inóculo, também acasalaram, com a mesma proporção de machos por fêmea.

A constatação do acasalamento foi feita pela presença de rolha vaginal, considerando-se o primeiro dia de gestação aquele em que cuja manhã observou-se a presença da mesma.

Nas três etapas descritas, as fêmeas foram sacrificadas e analisadas por estudos morfológicos no período de 17 a 20 dias de gestação (dias de análises).

As tabelas 1, 2 e 3 demonstram as idades gestacionais e de infecção dos grupos 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1: Relação dos animais do Grupo 1 com seus respectivos dias de infecção pré-concepção e dias de gestação na análise morfológica.

Grupo 1	Animais	Dias de Infecção pré-concepção (Rolha)	Dias de Gestação e Infecção na Análise Morfológica	
			Dias de Gestação	Dias de Infecção
	05	8	18	25
	06	9	17	25
	07	8	20	27
	08	13	19	25

Tabela 2: Relação dos animais do Grupo 2 com seus respectivos dias de infecção pré-concepção e dias de gestação na análise morfológica.

Grupo 2	Animais	Dias de Infecção pré-concepção (Rolha)	Dias de Gestação e Infecção na Análise Morfológica	
			Dias de Gestação	Dias de Infecção
	01	34	19	52
	02	33	18	50
	03	28	20	48
	04	35	17	51

Tabela 3: Relação dos animais do Grupo 3 com seus respectivos dias de infecção pré-concepção e dias de gestação na análise morfológica.

Grupo 3	Animais	Dias de Infecção pré-concepção (Rolha)	Dias de Gestação e Infecção na Análise Morfológica	
			Dias de Gestação	Dias de Infecção
	09	48	20	67
	10	50	19	68
	11	42	17	58
	12	57	18	74

Sangria

No dia da rolha vaginal (1º dia de gestação) e na data de sacrifício para cada idade gestacional mencionada no item anterior, os animais foram submetidos à sangria. Com auxílio de um capilar de vidro, uma amostra de sangue foi coletada do plexo orbital do animal, que estava anestesiado por inalação ao éter. Após algumas horas, o sangue foi centrifugado, seu soro coletado e armazenado a -20°C para análises sorológicas.

Sacrifício e coleta do material

Para cada idade de gestação correspondente, o animal foi anestesiado por inalação ao éter e sacrificado. Os embriões e placentas foram retirados e fixados com formol 10% em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7.4, conforme Ferro (2000).

Preparação do laminário histológico

Depois de fixadas, placentas de cada idade gestacional foram desidratadas, seguindo concentrações crescentes de álcool, e processadas segundo protocolo para inclusão em glicol metacrilato (Historesin, LKB, Bromma, Suécia). Posteriormente, cortes de dois micrômetros de espessura foram feitos e corados pelo azul de Toluidina a 0,25% em água destilada a 40°C (FERRO, 2000).

A documentação fotográfica foi realizada em um fotomicroscópio REICHERT-JUNG-POLYVAR (Lab. Óptica Robert KOCH, Áustria).

Análise Imunohistoquímica ao Microscópio de Luz

Placentas e embriões de cada idade gestacional foram desidratados, seguindo concentrações crescentes de álcool, e incluídos em parafina. Formados os blocos de parafina, cortes de quatro micrômetros foram processados segundo protocolo de Imunohistoquímica para detecção de *T. gondii*, conforme Ferro (2000). As lâminas foram incubadas em uma estufa de 60°C por 24 horas. Os cortes foram desparafinados em xilol hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e, por fim, em água corrente.

Após hidratação, os cortes foram incubados por oito minutos em solução de ácido acético a 5% para bloqueio da fosfatase endógena, em seguida lavados em água corrente e em solução salina tamponada com TRIS 0,05 M, pH 7,4 (TBS) por 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com soro normal de cabra a 2% em TBS por 20 minutos a 37°C; após este bloqueio, procedeu-se a incubação do material com anticorpo policlonal de coelho dirigido contra *T. gondii*, na diluição de 1:400 (produzido e cedido pelo Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia - Lab ImUFU), em TBS por 12 horas a 4°C. Após sucessivas lavagens em TBS, as lâminas foram incubadas com IgG de cabra anti-IgG de coelho biotinizada (Sigma, St Louis, USA) na diluição de 1:1000 em TBS por uma hora a 37°C. Após sucessivas lavagens, a reação foi amplificada pelo complexo avidina/ biotina (ABC)-fosfatase (Biomeda, Foster city, USA) na diluição de 1:100 em TBS, a 37°C por 30 minutos. Após novas lavagens em TBS, procedeu-se a revelação da enzima fosfatase alcalina com Fast Red-naftol (Sigma, St Louis, USA), em tampão TBS, lavagens em TBS e água corrente e contra-coloração com hematoxilina de Meyer, por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a diferenciação do corante em água amoniacal, as lâminas foram montadas com laminulas em

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

Testes Imunoenzimáticos: ELISA Clássico e ELISA Avidéz

Os soros provenientes das sangrias foram submetidos à análise, pelo teste ELISA, segundo Ferro (2000), para obtenção do índice ELISA (IE) e do índice de Avidéz (IA).

ELISA (IE) Clássico

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

sulfúrico 2N. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492nm.

Os resultados foram expressos em termos de índice ELISA, conforme Ferro (2000):

$$IE = DO_x / \text{Cutoff} \quad \text{Cutoff} = X(P-) + 3d$$

IE: índice ELISA

DO_x: densidade óptica da amostra

X (P-): média do padrão negativo

d: desvio padrão

Baseando-se na triagem prévia de soros controles negativos, obtidos de animais não infectados, foi estabelecido como limite de discriminação de reatividade o “cutoff” de valor igual a 1,2. Assim, foram consideradas amostras de soros positivas para anticorpos anti-*T. gondii* aquelas cujos valores foram iguais ou maiores que 1,2.

ELISA Avidéz

Para medir e avaliar a avidéz de anticorpos utilizou-se uréia, que funciona como agente desestabilizante de pontes de hidrogênio. Esta dissociação acarreta uma queda acentuada da reatividade do soro em infecções recentes e discretas em infecções antigas.

O teste ELISA Avidéz consistiu basicamente do mesmo procedimento descrito para o teste ELISA clássico, com modificações nos procedimentos de lavagens, utilizando-se solução de uréia a 6M como agente eluidor dos complexos imunes. Após a incubação das placas sensibilizadas com as respectivas amostras de soros testes e soros controles positivo e negativo, em quadruplicata, na diluição de 1:32, as placas foram submetidas a uma lavagem rápida com PBST. Em seguida, em uma duplicata das amostras, adicionou-se 200µl de solução de uréia 6M por 10 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este período as duas duplicatas de amostras

foram lavadas em PBST por três vezes. As etapas subsequentes de adição do conjugado, substrato enzimático e leitura da reatividade foram realizadas de modo similar ao descrito para ELISA clássico.

Os resultados foram expressos em termos de índice de avidéz (IA), conforme Ferro (2000):

$$IA = IE (T) / IE (NT) \times 100$$

IA: índice de Avidéz

IE (T): índice ELISA de amostras tratadas com uréia

IE (NT): índice ELISA de amostras não tratadas com uréia

III – RESULTADOS

Placenta de *Calomys callosus*

A placenta a termo de *Calomys callosus* constituiu-se por três regiões: camada decidual, zona juncional e zona do labirinto (Figura 1). Nas duas primeiras regiões da placenta, observou-se apenas sangue materno.

A camada decidual apresentou-se constituída por células deciduais apoiadas sobre o miométrio. Tais células eram globosas, muitas vezes justapostas, nucléolo evidente, cromatina frouxa e, algumas vezes, apresentaram-se interpostas pelas células granulosas metriais (Figura 2). Já a zona juncional apresentava células granulosas metriais, que envolviam os vasos sanguíneos maternos, bem como espongiotrofoblastos cercados por células trofoblásticas gigantes.

As células granulosas metriais, localizadas em volta dos vasos sanguíneos, caracterizaram-se por serem globosas ou irregulares, apresentando grânulos citoplasmáticos característicos, núcleo excêntrico e nucléolo evidente (Figura 3a).

Os espongiotrofoblastos, sempre envoltos por células trofoblásticas gigantes, eram semelhantes às células das esponjas, com amplos espaços regulares entre as células,

caracterizando-se por apresentarem núcleo excêntrico e eucromático, com um ou mais nucléolos (Figura 3b). As células trofoblásticas gigantes apresentaram um núcleo predominantemente excêntrico e eucromático, com um ou mais nucléolos evidentes. Em células trofoblásticas gigantes, observou-se pequenos grumos de heterocromatina e a presença de um halo perinuclear fracamente corado. Células trofoblásticas gigantes delimitando grupos de espongiotrofoblastos foram bastante observadas (Figura 3c).

O labirinto caracterizou-se por apresentar sangue materno extravasado e sangue fetal contido no interior de vasos sanguíneos fetais, advindos do mesênquima, bem como as células do labirinto (Figura 4a). Foi possível notar que algumas hemáceas fetais ainda permaneciam nucleadas.

As células do labirinto apresentaram-se de formas irregulares, núcleo predominantemente excêntrico, um ou mais nucléolos evidentes e uma cromatina frouxa (Figura 4b).

Após a infecção por *Toxoplasma gondii*, não se observou nenhuma alteração morfológica na placenta, mas foi possível notar a presença de parasitos em todas as suas camadas.

Dinâmica da transmissão congênita com animais de 8 a 13 dias de infecção pré-concepção (Grupo 1)

Análise Morfológica ao Microscópio de Luz

Neste grupo de fêmeas, os parasitos foram observados nas placentas de todas as idades gestacionais analisadas, ou seja, de 17 a 20 dias de gestação, quando os animais já estavam com 25 a 27 dias de infecção. As células da zona do labirinto e a região de transição desta para a zona juncional foram os locais de maior frequência de observação de parasitos.

Grupos de parasitos foram verificados logo abaixo dos espongiotrofoblastos, invadindo células do labirinto e ocupando quase que totalmente seu espaço citoplasmático (Figuras 5a, 5b e 5c).

A região do labirinto próxima ao mesênquima também se apresentou infectada. Os parasitos ocuparam parte do citoplasma das células do labirinto (Figura 6a).

Grupos de *T. gondii* também foram observados no interior das células decíduais. Os parasitos, dentro de seus vacúolos parasitóforos, tomaram quase que totalmente as células decíduais (Figura 6b). Alguns parasitos foram observados entre os grupos de espongiotrofoblastos, no interior de célula trofoblástica gigante (Figura 6c).

Análise Imunohistoquímica ao Microscópio de Luz

As placentas dos animais do grupo 1, analisadas pela imunohistoquímica, apresentaram-se infectadas, com presença de *T. gondii* no labirinto e região do espongiotrofoblasto (Figuras 7a e 7b).

Os embriões apresentaram-se multi-infectados, incluindo as áreas do encéfalo (Figuras 8a, 8b, 8c, 8d e 8e), fígado (Figuras 9a e 9b) e dorso (Figura 10), abrangendo tecido conjuntivo e região retro-abdominal.

Testes Imunoenzimáticos: ELISA Clássico e ELISA Avidex

Três dos quatro soros coletados no primeiro dia de gestação (presença de rolha vaginal) não mostraram reação positiva no ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, portanto não foram calculados seus índices de Avidex. O único animal que exibiu sorologia positiva no ELISA, no primeiro dia de gestação, apresentou baixo índice de avidex: 38,2% (Gráficos 1A e 1B).

Já os soros analisados aos 17 a 20 dias de gestação, quando os animais já estavam com 25 a 27 dias de infecção, mostraram reação positiva no ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. E, com relação aos índices de Avidex, apresentaram valores com uma média de 51% (39 a 62%) (Gráficos 1A e 1B).

Dinâmica da transmissão congênita com animais de 28 a 35 dias de infecção pré-concepção

(Grupo 2)

Análise Morfológica ao Microscópio de Luz

No segundo grupo de fêmeas, os parasitos também foram observados nas placentas de todas as idades gestacionais analisadas, ou seja, de 17 a 20 dias de gestação, quando os animais já estavam com 48 a 52 dias de infecção, incluindo principalmente regiões do labirinto. No entanto, os parasitos apresentaram uma frequência aparentemente menor com relação às fêmeas do primeiro grupo.

As células da região do labirinto próximas ao mesênquima apresentaram-se invadidas por protozoários. Os parasitos ocuparam parte do citoplasma das células labirínticas (Figuras 11a e 11b).

Análise Imunohistoquímica ao Microscópio de Luz

As placentas dos animais do grupo 2, analisadas pela imunohistoquímica, revelaram protozoários, principalmente na zona do labirinto (Figura 12).

Os embriões também se apresentaram infectados por parasitos, mas com uma frequência aparentemente menor, confirmando o resultado da análise morfológica. Os fetos foram infectados principalmente na região do encéfalo e áreas próximas ao fígado, no dorso dos embriões (Figuras 13a, 13b, 13c e 13d).

Testes Imunoenzimáticos: ELISA Clássico e ELISA Avidéz

Os soros provenientes destas fêmeas, tanto no primeiro dia de gestação quanto nos dias de sacrifícios (17 a 20 dias de gestação), quando os animais já estavam com 48 a 52 dias de infecção, apresentaram-se positivos no ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (Gráfico 2A).

Quanto aos índices de Avidéz, os animais, no primeiro dia de gestação, mostraram valores numa média de 63% (58% a 66%). E, de 17 a 20 dias de gestação, apresentaram valores com uma média também de 65% (54% a 80%) (Gráfico 2B).

**Dinâmica da transmissão congênita em animais de 42 a 57 dias de infecção pré-concepção
(Grupo 3)**

Análise Morfológica ao Microscópio de Luz

No terceiro grupo de fêmeas não foi demonstrada a presença de *T. gondii*. As placentas de todas as idades gestacionais correspondentes (17 a 20 dias de gestação), quando as fêmeas já estavam com 58 a 74 dias de infecção, apresentaram-se sem infecção, ou seja, nenhuma célula placentária estava infectada (Figuras 14a e 14b).

Análise Imunohistoquímica ao Microscópio de Luz

No terceiro grupo de fêmeas, a análise imunohistoquímica não revelou a presença de parasitos nas placentas e embriões (Figuras 15a, 15b e 15c).

Testes Imunoenzimáticos: ELISA Clássico e ELISA Avidéz

Os soros provenientes destas fêmeas, tanto no primeiro dia de gestação quanto aos 17 a 20 dias de gestação, quando os animais já estavam com 58 a 74 dias de infecção, apresentaram-se positivos no ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (Gráfico 3A).

Quanto aos Índices de Avidéz, no primeiro dia de gestação, revelaram valores com uma média de 72% (61% a 91%). E, de 17 a 20 dias de gestação, apresentaram valores com uma média de 73% (71% a 78%) (Gráfico 3B).

IV – DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram a transmissão congênita da toxoplasmose, em *Calomys callosus*, nos diferentes períodos de infecção materna. Para efeito de maior compreensão, estes dados serão discutidos separadamente.

Placenta de *C. callosus*

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

A camada decidual corresponde à porção materna da placenta. As células deciduais justapostas apresentaram-se, algumas vezes, interpostas por células granulosas metriais. Além disso, verificou-se que tais células mantinham uma certa proximidade com os vasos sangüíneos maternos. Esta distribuição celular foi semelhante em outros roedores (CROY et al., 1991).

A zona juncional e o labirinto correspondem à porção fetal da placenta. A primeira apresentou-se composta pelas células granulosas metriais, que envolviam os vasos sangüíneos maternos, bem como espongiotrofoblastos circundados por células trofoblásticas gigantes.

As células granulosas metriais, como observado por Peel (1989), mostraram-se globosas, na maioria das vezes, um núcleo excêntrico, além dos grânulos citoplasmáticos característicos. As células trofoblásticas gigantes formavam uma rede celular em volta dos espongiotrofoblastos, que são células em forma de esponja, com relativos espaços intercelulares, como descrito em ratos por Jollie (1965).

Semelhante aos outros roedores, o labirinto correspondeu à maior área da placenta. Esta região é considerada a mais importante, uma vez que é o local onde se realizam as trocas fisiológicas entre mãe e feto. Observou-se a presença de sangue materno extravasado, banhando as células do labirinto, bem como sangue fetal contido no interior de vasos. Não havia misturas de sangues materno e fetal graças à presença da barreira placentária. Como relatado por Limongi (2002), três camadas de células trofoblásticas mais o endotélio fetal constituem esta barreira placentária que, com o decorrer da gestação, torna-se cada vez mais delgada.

Períodos de Transmissão Congênita em Roedores

Desde a década de 50, ratos e camundongos são freqüentemente utilizados como modelos experimentais de estudo de doenças parasitárias como a toxoplasmose (FERRO, 2000). No entanto, em camundongos, a transmissão congênita dessa patologia se dá tanto na fase aguda quanto na fase crônica, ao contrário da espécie humana (BERVELY, 1959; REMINGTON et al., 1961). Assim, a transmissão congênita em camundongos se dá por sucessivas gerações, não simulando o observável no homem, no qual a transmissão congênita apenas acontece na fase aguda da doença. Apesar disso, Roberts e Alexander (1992) relataram, em camundongos BALB/c inoculados com a cepa RRA, a transmissão congênita de *T. gondii* nas etapas iniciais da gestação apenas na primeira geração. Esses dados permitem dizer que o camundongo BALB/c pode ser usado como modelo experimental para estudo da doença.

É bastante difícil induzir uma transmissão congênita em ratos, uma vez que estes animais são bastante resistentes à infecção por *T. gondii* (REMINGTON et al., 1961). Alguns autores relatam a possibilidade de infecção congênita em ratos através da utilização de cistos da cepa CT-1, independente do período de gestação em que ocorre a infecção (DUBEY; SHEN, 1991; OKAY, 1994). Além do mais, utilizando as cepas RH, 76K e *Prugnialud*, é possível se obter a transmissão vertical da doença em ratos, mas apenas quando a infecção materna ocorre entre o 8º e o 12º dias de gestação. Ratos das linhagens Wistar e Holtzman, quando infectados com a cepa P de *T. gondii*, transmitem a doença para a sua prole. E, quando as mães encontram-se na fase crônica, a transmissão congênita não ocorre, mesmo quando re-infectadas com a mesma cepa (PAULINO; VITOR, 1999).

Portanto, de maneira geral, ratos podem ser adequados como modelos experimentais para o estudo da toxoplasmose congênita, embora haja uma pequena porcentagem de transmissão congênita da doença em ratos infectados cronicamente com diferentes cepas, contrariando o que se observa na espécie humana (DUBEY et al., 1997).

Ferro e colaboradores (2002) demonstraram que *Calomys callosus*, um cricetídeo sul americano infectado com a cepa ME-49 de *T. gondii*, transmite verticalmente a doença apenas na fase aguda da doença, de maneira semelhante ao que ocorre na espécie humana. Isto o torna um excelente modelo experimental de estudo da toxoplasmose, justificando seu uso neste presente trabalho.

Análise sorológica das fêmeas procedentes do grupo 1 (8 a 13 dias de infecção pré-concepção e 25 a 27 dias de infecção aos 17 a 20 dias de gestação)

Estas fêmeas, no primeiro dia de gestação (rolha), apresentaram-se soronegativas no ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, exceto o animal 08, que tinha 13 dias de

infecção pré-concepção. Devido à infecção muito recente, tais animais não mostraram soroconversão que pudesse ser detectada pelo teste ELISA. Portanto, o índice de avidéz não pôde ser calculado para estas fêmeas neste período, exceto para o animal 08, que apresentou uma baixa avidéz, equivalente a 38,2%, caracterizando a fase aguda da toxoplasmose.

Aos 17 a 20 dias de gestação, os soros positivos no ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* exibiram uma avidéz de anticorpos crescente, com uma média de 51%, sugerindo ainda uma fase aguda da doença.

Análise sorológica das fêmeas procedentes do grupo 2 (28 a 35 dias de infecção pré-concepção e 48 a 52 dias de infecção aos 17 a 20 dias de gestação)

Estas fêmeas apresentaram-se positivas para anticorpos anti-*T. gondii* tanto no primeiro dia quanto aos 17 a 20 dias de gestação. Isto significa que tais animais já produziram um nível de anticorpos capaz de ser detectado pelo teste ELISA. Seus índices de avidéz tiveram uma média de 63% no primeiro dia de gestação e 65% aos 17 a 20 dias de gestação, mostrando que, neste período, os animais apresentaram maior tendência a cronicidade.

Análise sorológica das fêmeas procedentes do grupo 3 (42 a 57 dias de infecção pré-concepção e 58 a 74 dias de infecção aos 17 a 20 dias de gestação)

Estas fêmeas apresentaram-se positivas para anticorpos anti-*T. gondii* desde o primeiro dia até aos 17 a 20 dias de gestação. Seus índices de avidéz também foram relativamente altos: uma média de 72% no primeiro dia de gestação e 73% aos 17 a 20 dias de gestação, caracterizando a infecção já na sua fase crônica.

Transmissão congênita de *T. gondii* nas fêmeas de *Calomys callosus* procedentes dos grupos 1 (25 a 27 dias de infecção nas datas de sacrifício – 17 a 20 dias de gestação) e 2 (48 a 52 dias de infecção nas datas de sacrifício - 17 a 20 dias de gestação)

As idades do 17º ao 20º dias de gestação foram selecionadas porque, caso houvesse realmente a transmissão congênita, os parasitos já seriam vistos nas placentas e tecidos fetais nesta etapa final da gestação, uma vez que as primeiras células placentárias infectadas, em *C. callosus*, foram datadas no 15º dia de gestação (FERRO et al., 2002).

Os resultados, oriundos das fêmeas pertencentes aos grupos 1 e 2, levam à conclusão de que ainda ocorre a transmissão congênita da toxoplasmose, em *Calomys callosus*, com cerca de cinquenta dias após infecção materna por *T. gondii*. Foi observado que o número de células placentárias e fetais infectadas foi aparentemente maior nas fêmeas do primeiro grupo e, conseqüentemente, este número aparentemente caiu nas fêmeas do segundo grupo, ou seja, a frequência de parasitos foi aparentemente maior em placentas e embriões oriundos de fêmeas com 25 a 27 dias de infecção.

Os dados mostraram que houve, no grupo 2, a transmissão congênita da toxoplasmose na fase crônica da doença, similarmente a ratas prenhes infectadas cronicamente, nas quais há uma baixa porcentagem de infecção congênita (DUBEY et al., 1997). O que não foi visto por Ferro e colaboradores (2002), em que a transmissão congênita da toxoplasmose ocorreu apenas na fase aguda da doença.

Com relação à infecção fetal, o órgão mais comprometido foi o encéfalo, seguido pelo fígado e região dorsal dos embriões (retro-abdominal), abrangendo tecido conjuntivo, diferentemente de Favoreto-Junior e colaboradores (1998) que, utilizando a cepa RH de *T. gondii*, relataram o fígado como o órgão mais afetado e, por último, o cérebro.

Transmissão congênita de *T. gondii* nas fêmeas de *Calomys callosus* procedentes dos grupos 3 (58 a 74 dias de infecção nas datas de sacrifício – 17 a 20 dias de gestação)

O fato de não haver transmissão congênita nas fêmeas do **Grupo 3**, mesmo estas sendo positivas para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* pelo teste ELISA, leva à conclusão de que, com cerca de sessenta dias de infecção materna por *T. gondii*, os embriões estiveram protegidos da infecção, enquanto que Ferro (2000) não mais observou a transmissão congênita do parasito após 100 dias de infecção materna.

Portanto, é possível dizer que, com cerca sessenta dias de infecção materna por *T. gondii*, não mais se transmite a toxoplasmose para a prole, uma vez que a mãe adquiriu uma soroconversão capaz de proteger o feto contra a toxoplasmose.

Todos esses dados enfatizam que *C. callosus* é um excelente modelo de estudo da toxoplasmose congênita, uma vez que a transmissão vertical da doença se dá de maneira semelhante aos humanos, ou seja, na fase aguda. Além disso, nossos dados permitiram que se estabelecesse o período de aquisição de resistência para a transmissão congênita da toxoplasmose. Assim, a partir de aproximadamente sessenta de infecção materna, não se observa mais a transmissão vertical da parasitose em *Calomys callosus*.

V – CONCLUSÃO

A análise dos dados aqui apresentados permite concluir que:

1. Observou-se a presença de *Toxoplasma gondii* em placentas procedentes de mães dos grupos 1 e 2, ou seja, animais com cerca de 25 a 50 dias de infecção aos 17 a 20 dias de gestação. A presença do protozoário foi observada nas camadas decíduais, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto (zona juncional) e, principalmente, no labirinto.
2. Tecidos fetais das fêmeas dos grupos 1 e 2 apresentaram *T. gondii* preferencialmente nas regiões de encéfalo, fígado e área dorsal do embrião, compreendendo a região retro-abdominal.
3. As fêmeas do grupo 3, ou seja, animais com cerca de 60 dias de infecção aos 17 a 20 dias de gestação, não apresentaram células placentárias e fetais infectadas por *T. gondii*. Isto significa que não houve a transmissão congênita da toxoplasmose neste grupo de fêmeas.
4. *Calomys callosus* do grupo 1 exibiram um perfil sorológico de fase aguda da doença. No grupo 2, houve um direcionamento para a fase crônica da doença, enquanto que, no grupo 3, houve um perfil bem estabelecido de fase crônica da toxoplasmose.

5. A aquisição de resistência materna, num período pré-concepção, no sentido de prevenir a transmissão congênita da toxoplasmose ocorre com cerca de sessenta dias de infecção materna.

Assim, *C. callosus* mostra-se como excelente modelo biológico para estudo da toxoplasmose congênita, uma vez que simula a situação observada em humanos. Além disso, foi possível estabelecer, com relativa precisão, um período materno de aquisição de resistência à transmissão congênita da toxoplasmose: sessenta dias de infecção materna.

GRÁFICOS

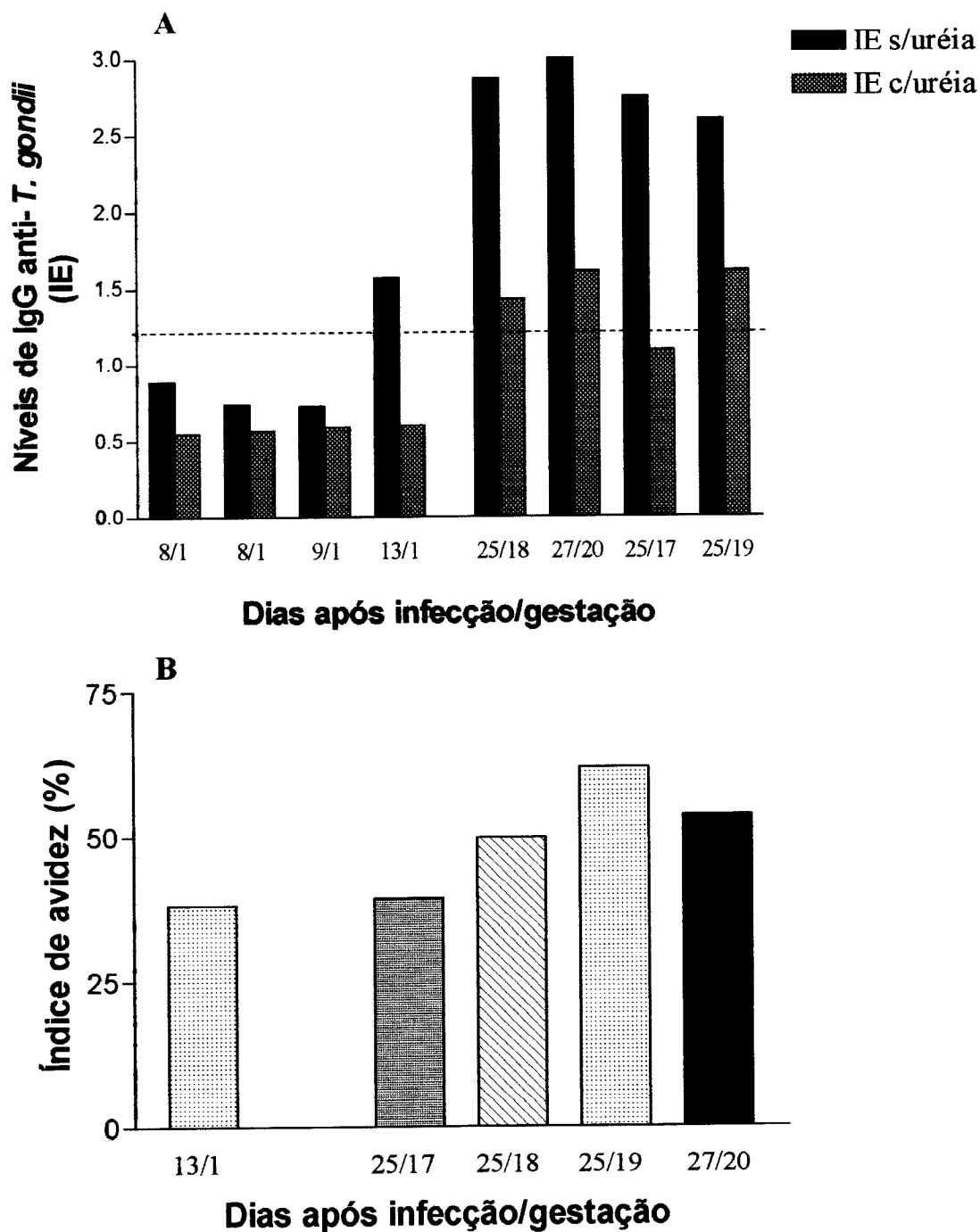


Gráfico 1. (A) Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* determinados por Índice ELISA (IE) clássico (IE sem uréia) e ELISA avidez (IE com uréia) e **(B)** Índice de avidez (%) em soros de fêmeas do grupo 1 (8-13 dias de infecção pré-concepção) em diferentes dias após infecção/gestação. A linha tracejada indica o limite de positividade do IE – 1,2.

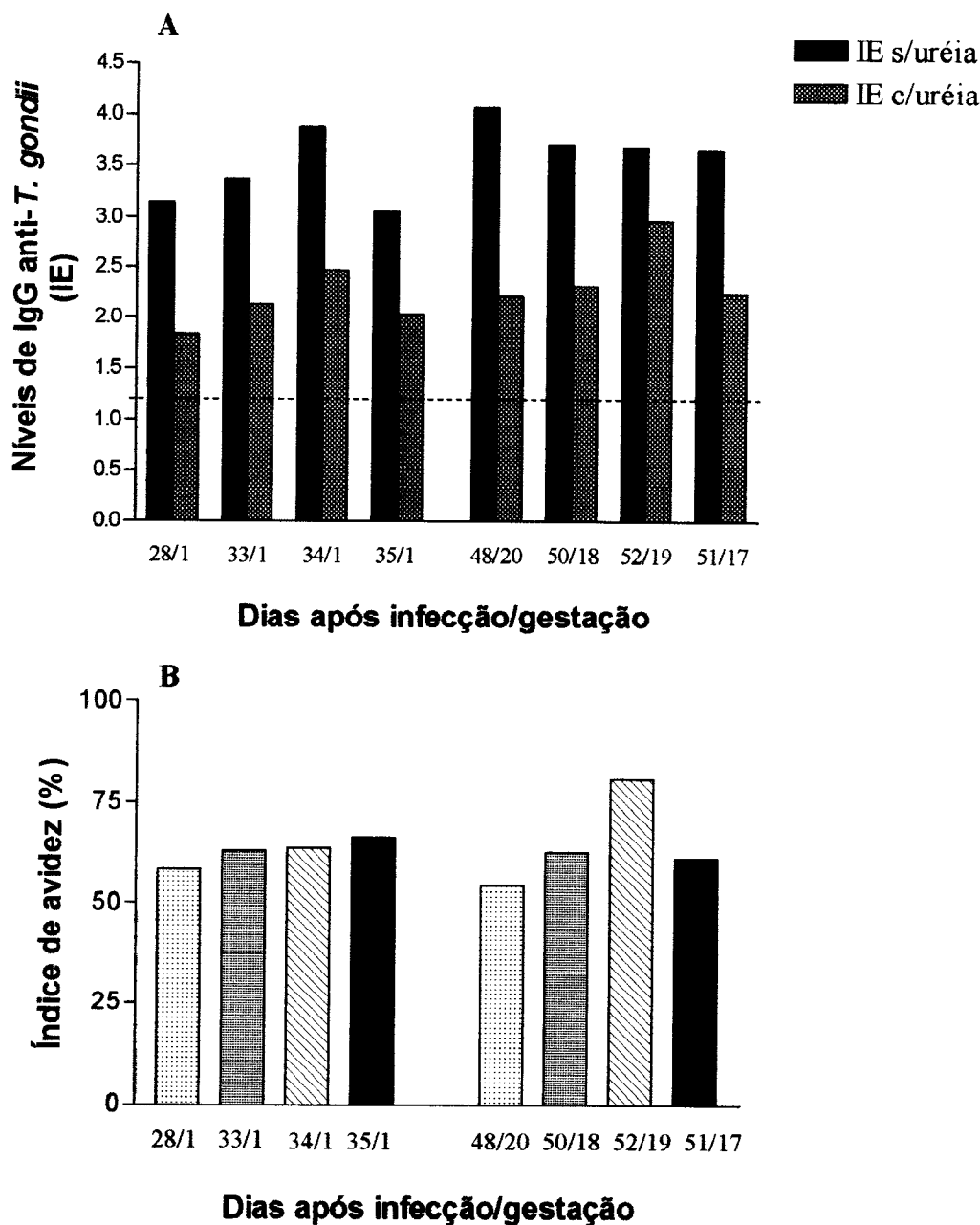


Gráfico 2. (A) Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* determinados por Índice ELISA (IE) clássico (IE sem uréia) e ELISA avides (IE com uréia) e **(B)** Índice de avides (%) em soros de fêmeas do grupo 2 (28-35 dias de infecção pré-concepção) em diferentes dias após infecção/gestação. Alinha tracejada indica o limite de positividade do IE – 1,2.

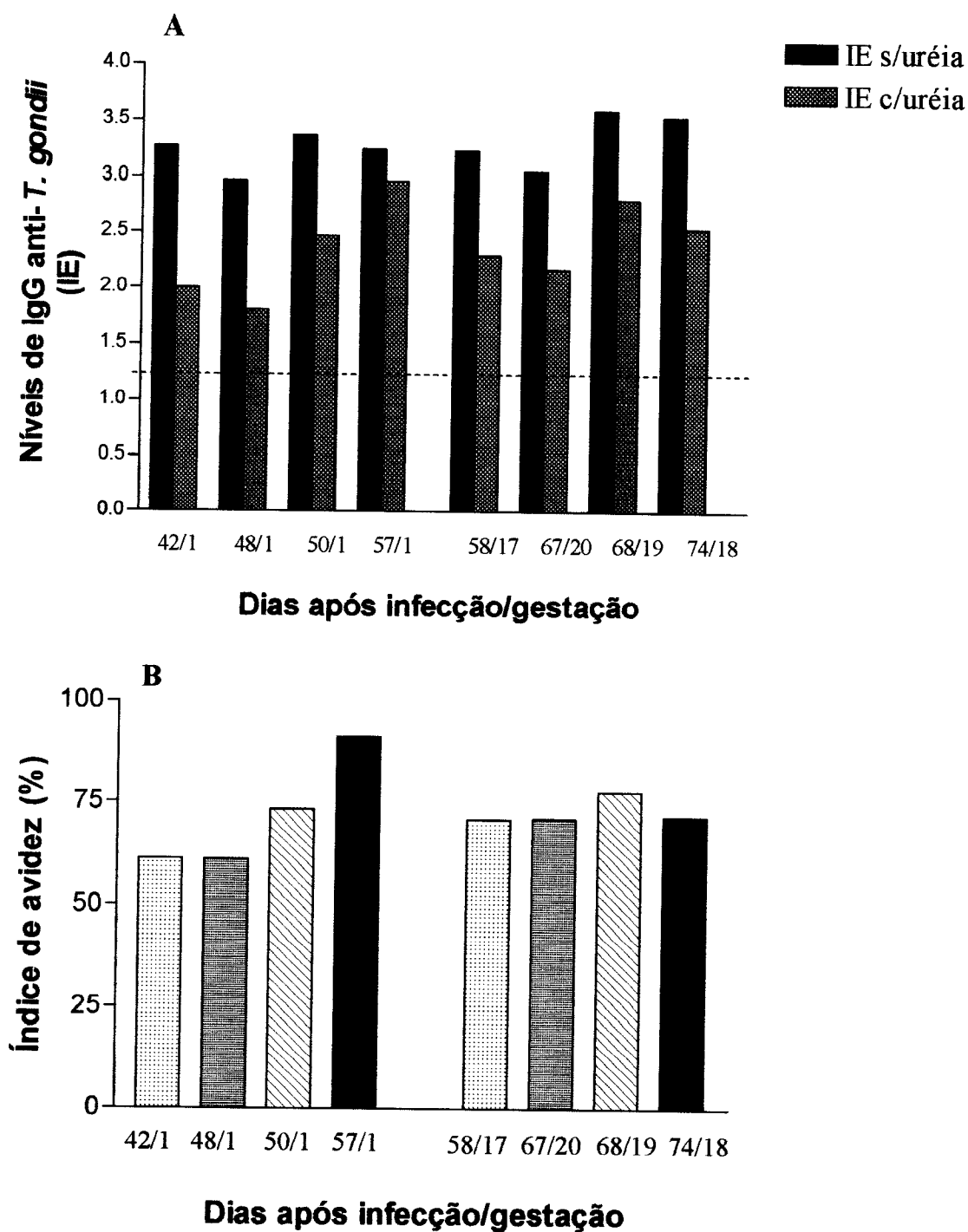


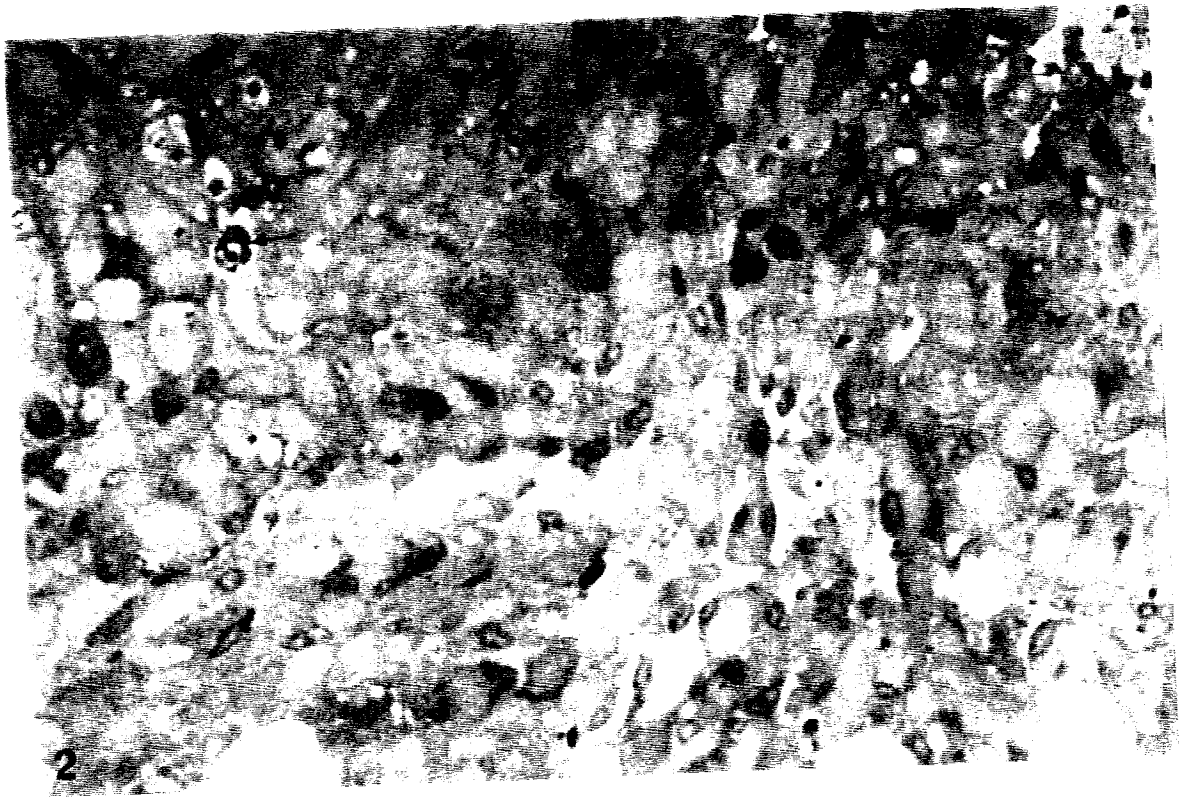
Gráfico 3. (A) Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* determinados por Índice ELISA (IE) clássico (IE sem uréia) e ELISA avides (IE com uréia) e **(B)** Índice de avides (%) em soros de fêmeas do grupo 3 (42-57 dias de infecção pré-concepção) em diferentes dias após infecção/gestação. Alinha tracejada indica o limite de positividade do IE – 1,2.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figura 1: Placenta a termo de *Calomys callosus* mostrando suas três regiões: camada decidual, zona juncional (seta) e zona do labirinto (L). Fotomicrografia, azul de Toluidina, 20X.



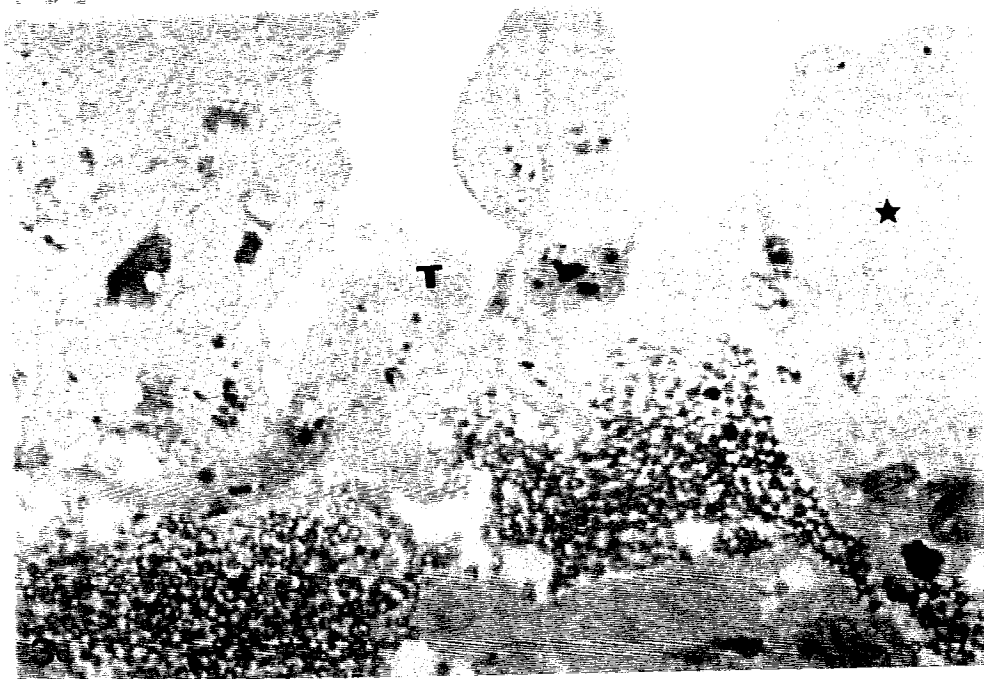
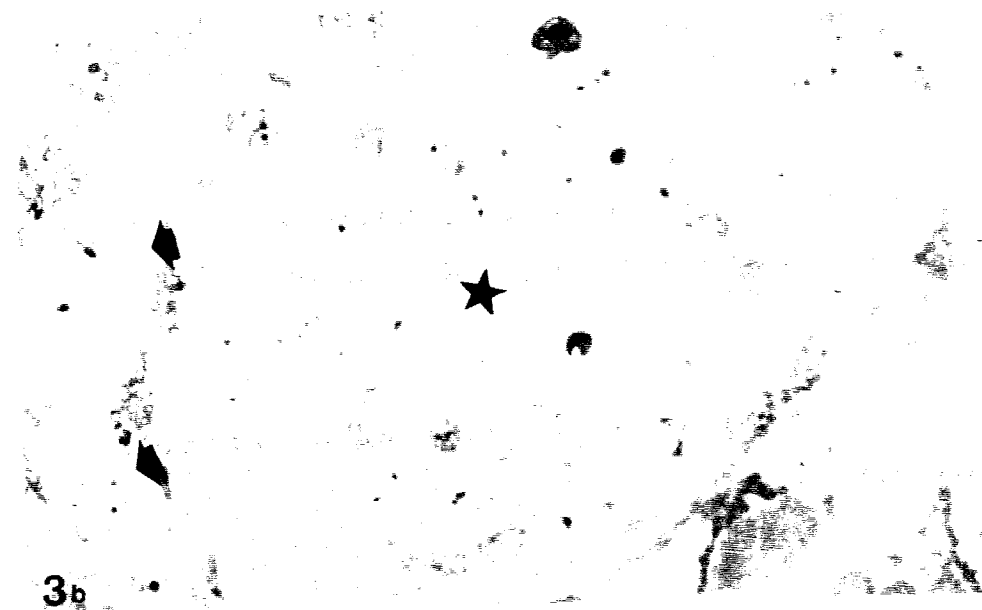
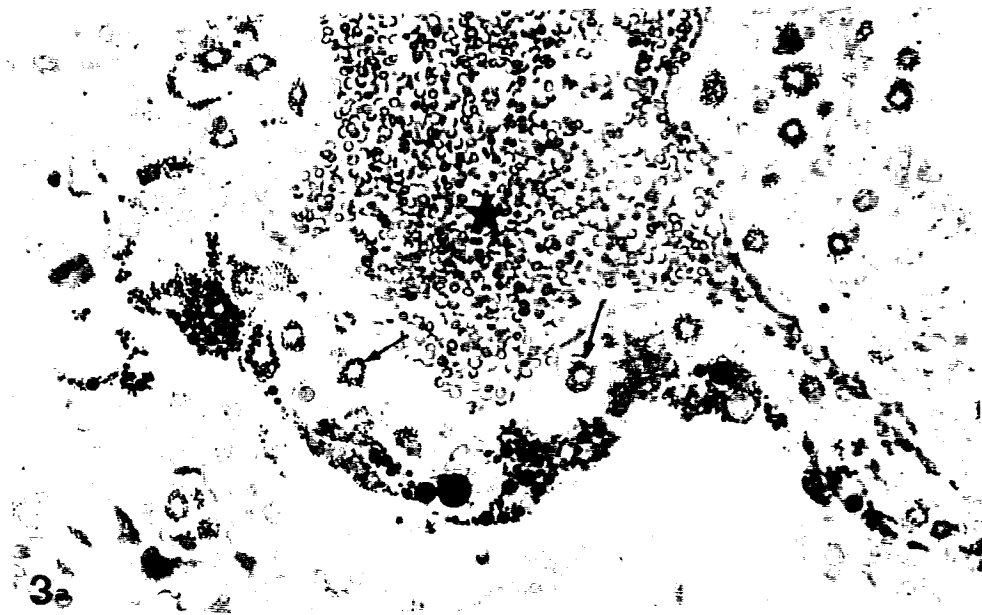
Figura 2: Camada Decidual evidenciando as células deciduais interpostas por células granulosas metriais (seta). Observar as células deciduais justapostas. Azul de Toluidina, 200X.



2

Figuras 3: Zona Juncional da Placenta

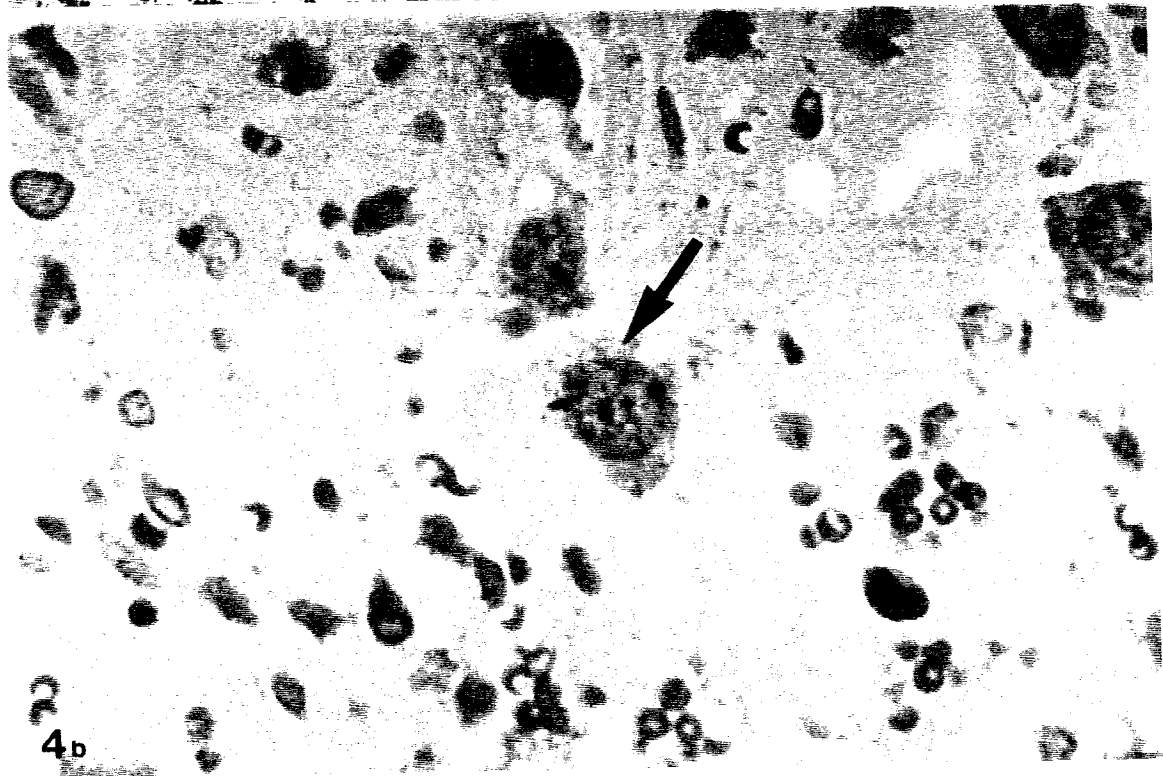
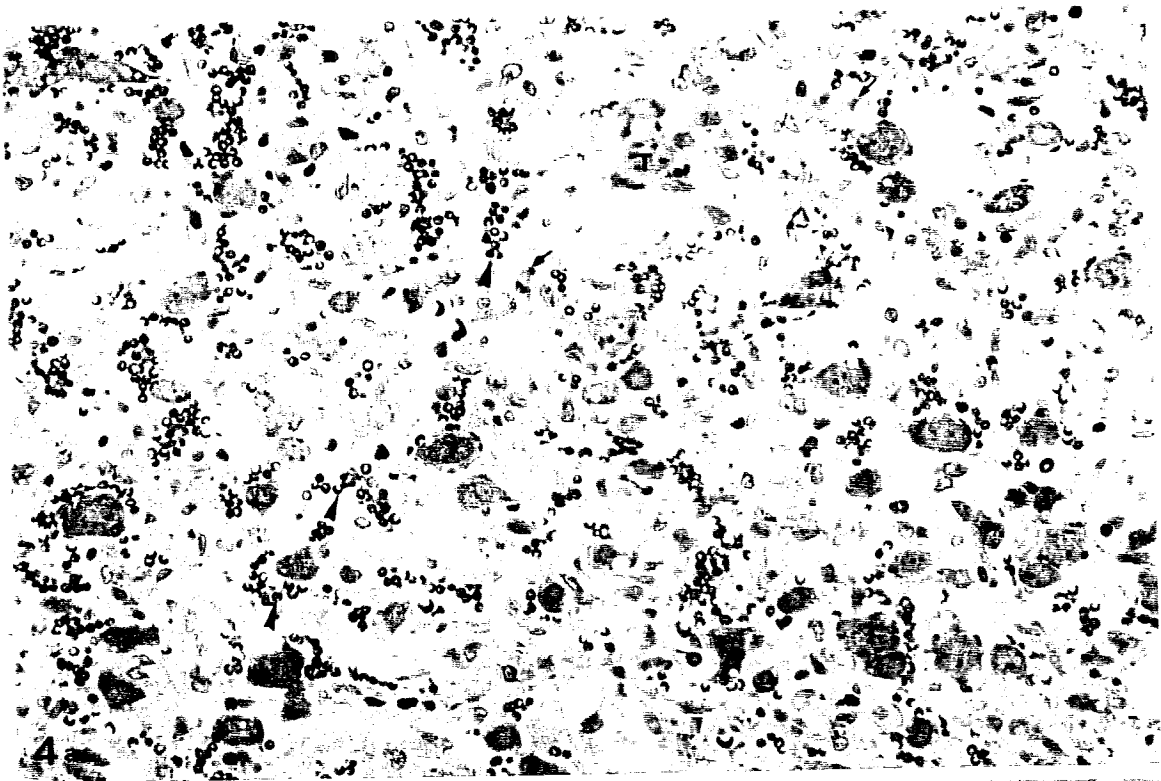
3a: Células Granulosas Metriais (setas) envolvendo o vaso sanguíneo materno (estrela). **b:** Grupo de espongiotrofoblastos (estrela) envolvidos por células trofoblásticas gigantes (setas). Observar, nos espongiotrofoblastos, núcleo eucromático e a presença do nucléolo. **c:** Células Trofoblásticas Gigantes (T) próximas aos grupos de espongiotrofoblastos (estrelas). Observar a presença dos nucléolos, cromatina frouxa e grumo de heterocromatina. **a, b, c:** Azul de Toluidina, 200X.



Figuras 4: Zona do Labirinto

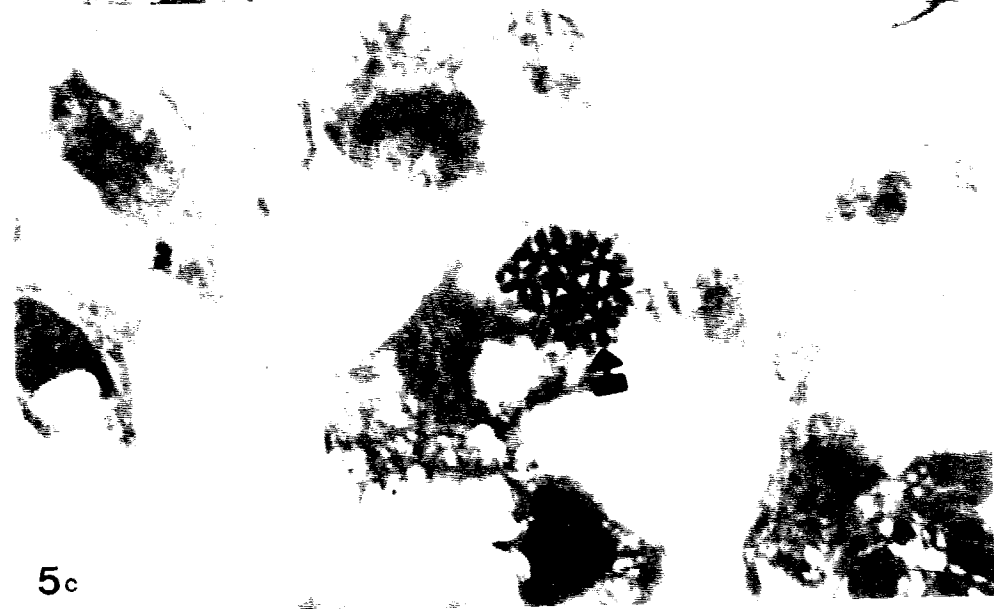
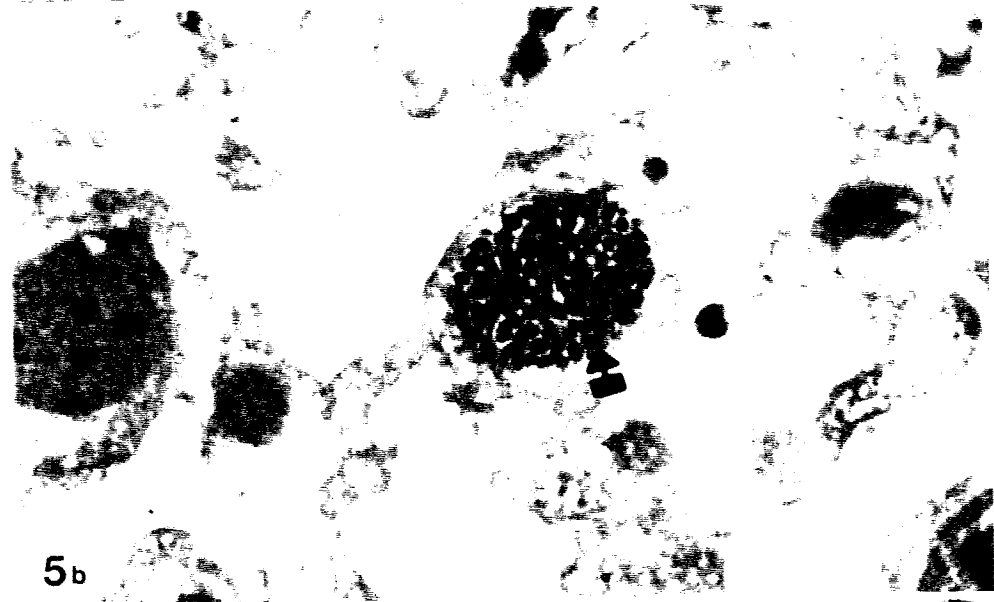
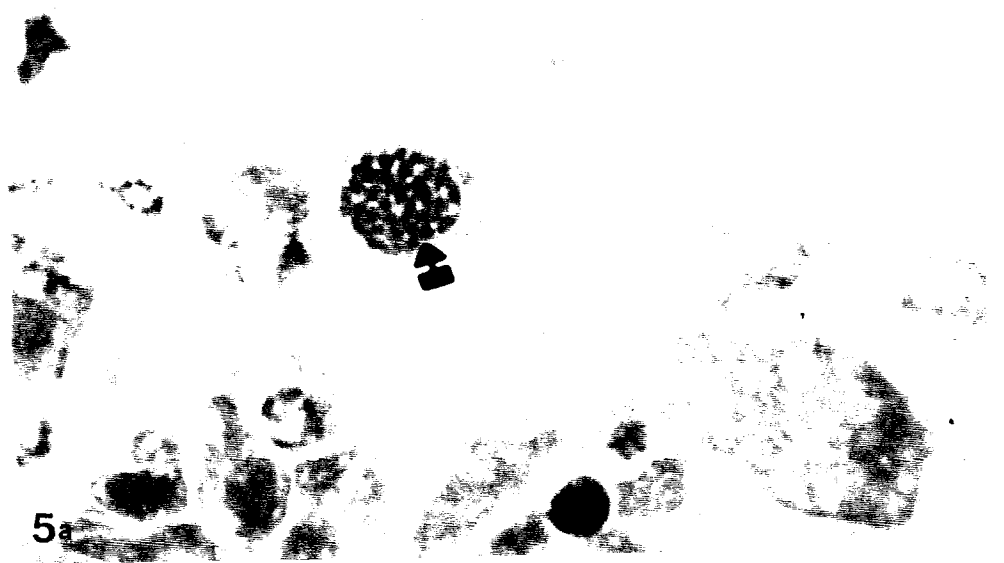
4a: Região do Labirinto mostrando as suas células trofoblásticas (T) bem como sangue materno extravasado (cabeças de setas) e sangue fetal (setas) contido dentro de vasos. Azul de Toluidina, 200X.

4b: Observar célula do labirinto (seta) com o núcleo excêntrico, nucléolos e eucromatina. Azul de Toluidina, 500X.



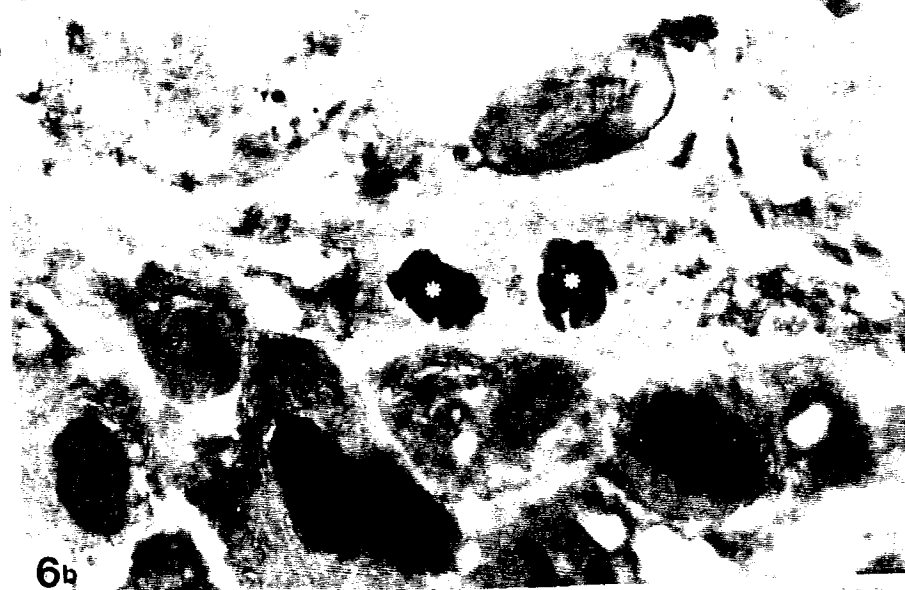
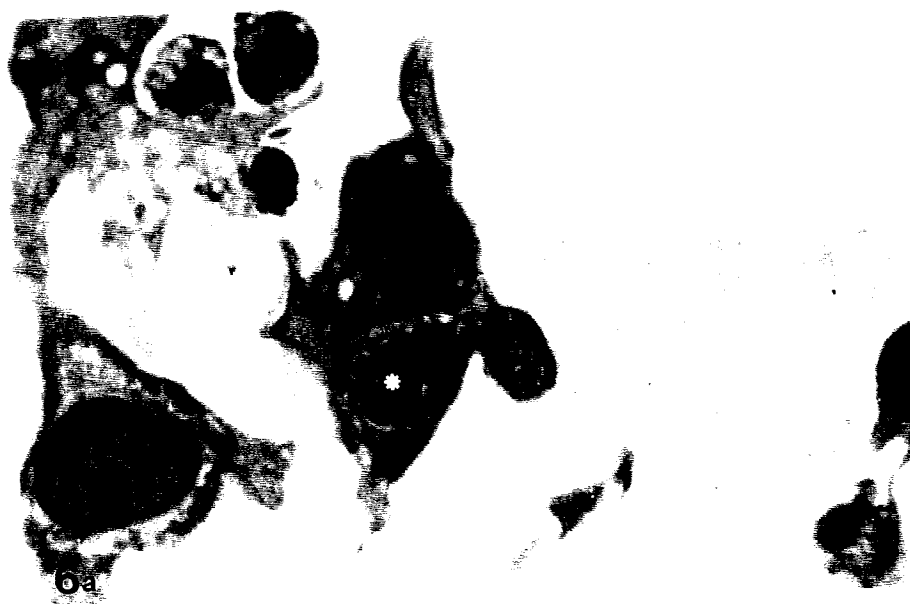
Figuras 5: Animais com 25 a 27 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

5a, b, c: Grupos de parasitos em células do labirinto (setas), na região de transição para a área de espongiotrofoblastos. Azul de Toluidina, 500X.



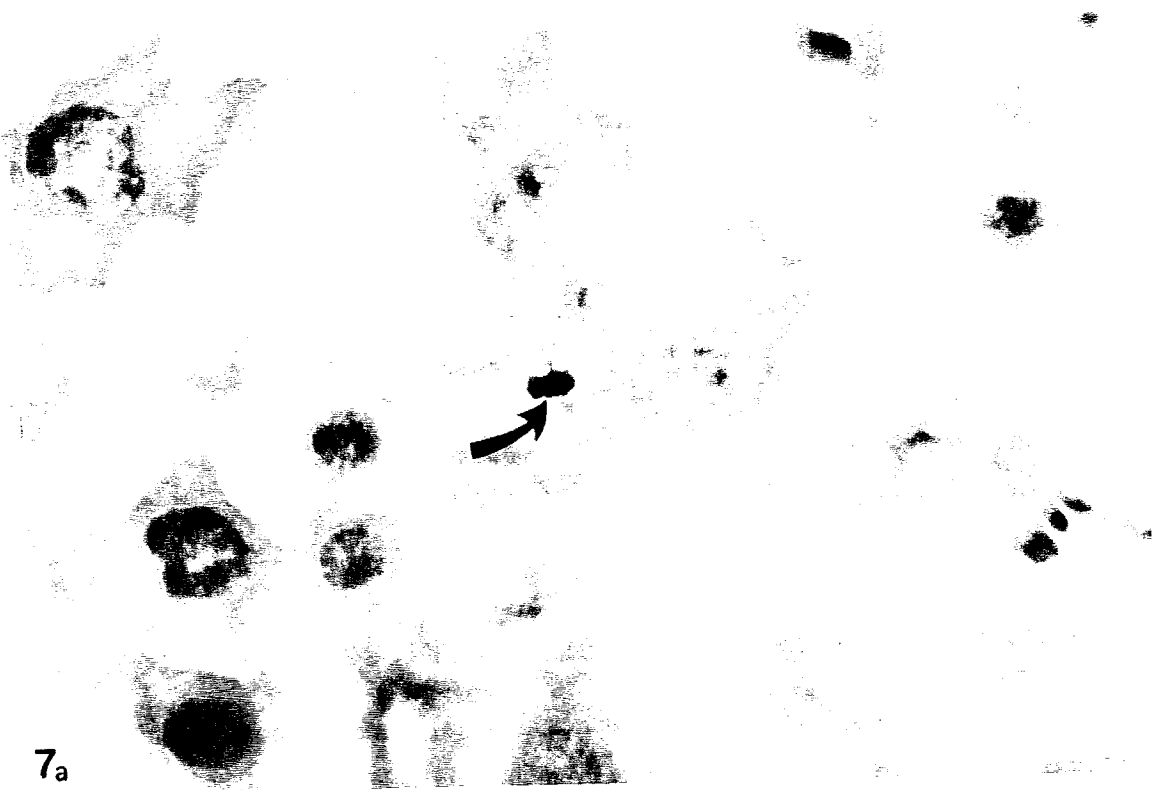
Figuras 6: Animais com 25 a 27 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

6a: Grupo de protozoários (asterisco) na região do labirinto próximo ao mesênquima. Observar como os parasitos ocupam grande parte da célula do labirinto. **b:** Grupos de protozoários (asteriscos) nas células decíduais na decídua basal da placenta. **c:** Parasito no interior de célula trofoblástica gigante (asterisco), entre grupos de espongiotrofoblastos (estrelas). **a-c:** Azul de Toluidina, 500X.



Figuras 7: Animais com 25 a 27 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

7a: Presença de parasitos (seta) na região de labirinto da placenta. Observar que o protozoário está fora da célula, no espaço vascular materno. **b:** Presença de parasitos (seta) no interior do espongiotrofoblasto, na zona juncional da placenta. **a-b:** Imunohistoquímica evidenciada pela fosfatase alcalina revelada pelo *fast red*-naftol. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, 500X.



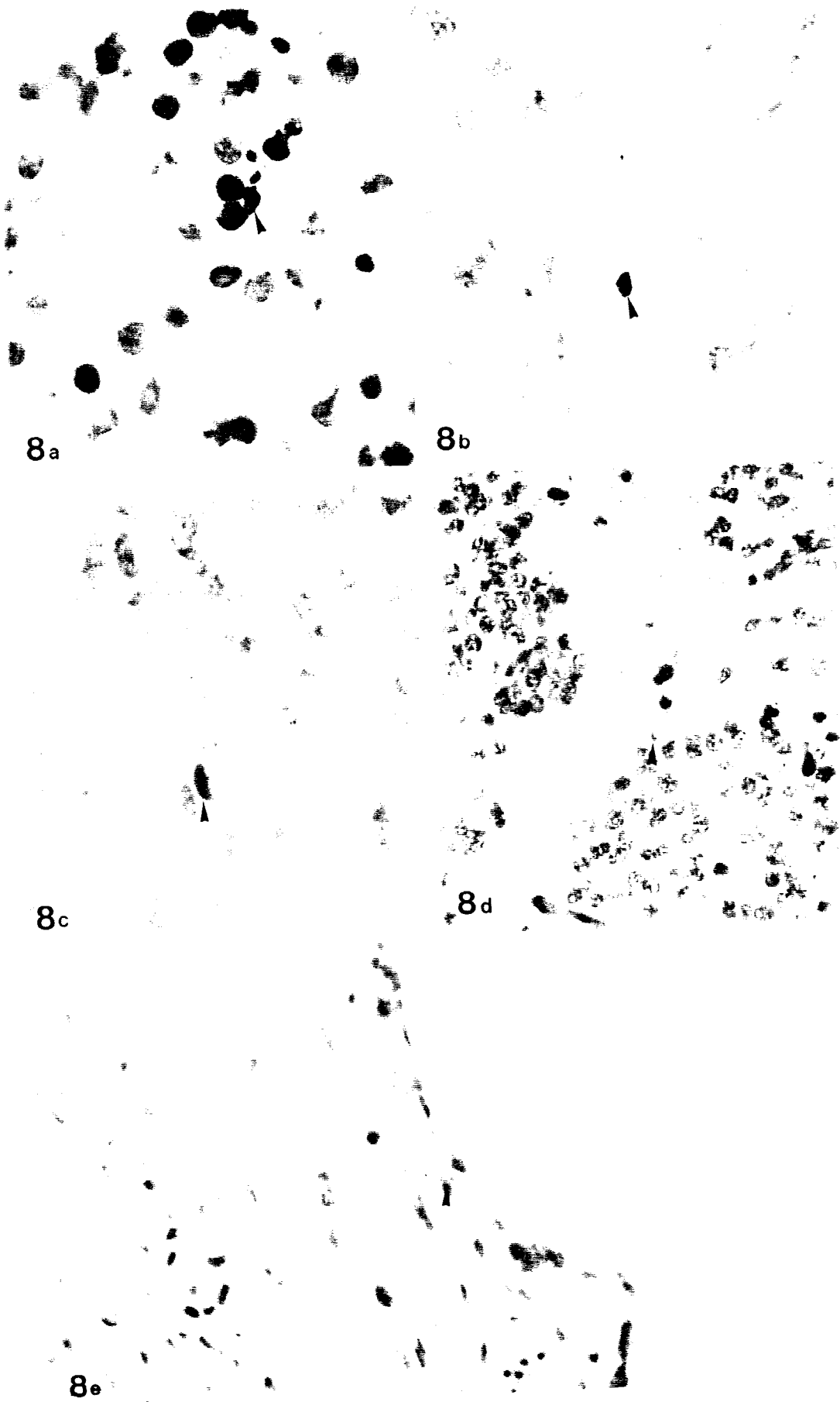
7a



7b

Figuras 8: Animais com 25 a 27 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

8a, b, c, d, e: Presença de parasitos (cabeça de seta) nas áreas de encéfalo (Sistema Nervoso Central) dos embriões. Imunohistoquímica evidenciada pela fosfatase alcalina revelada pelo *fast red*-naftol. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, **a-c:** 500X, **d-e:** 200X.



Figuras 9: Animais com 25 a 27 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

9a: Parasitos (seta) nas células hepáticas (estrelas) do embrião. **b:** Parasitos (seta) na região do fígado do embrião. Observar que o protozoário não está no interior das células hepáticas, mas no espaço existente entre elas. **a-b:** Imunohistoquímica evidenciada pela fosfatase alcalina revelada pelo *fast red*-naftol. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, 500X.

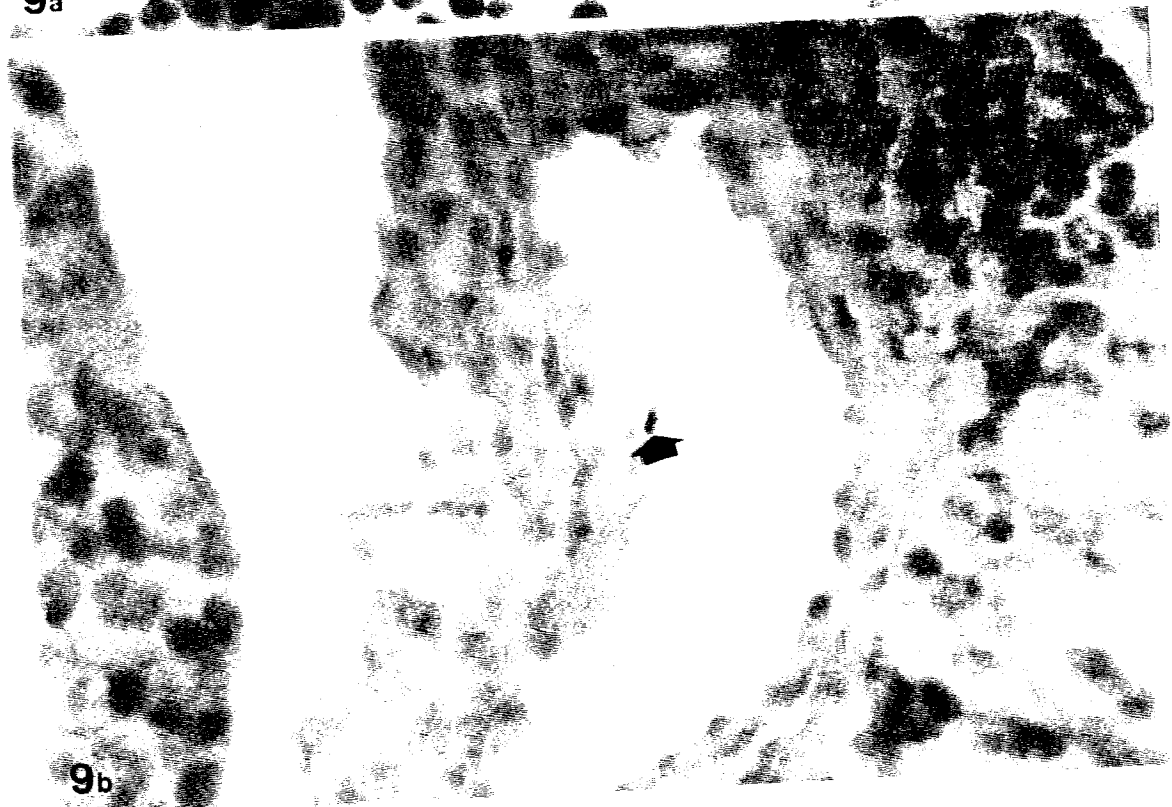
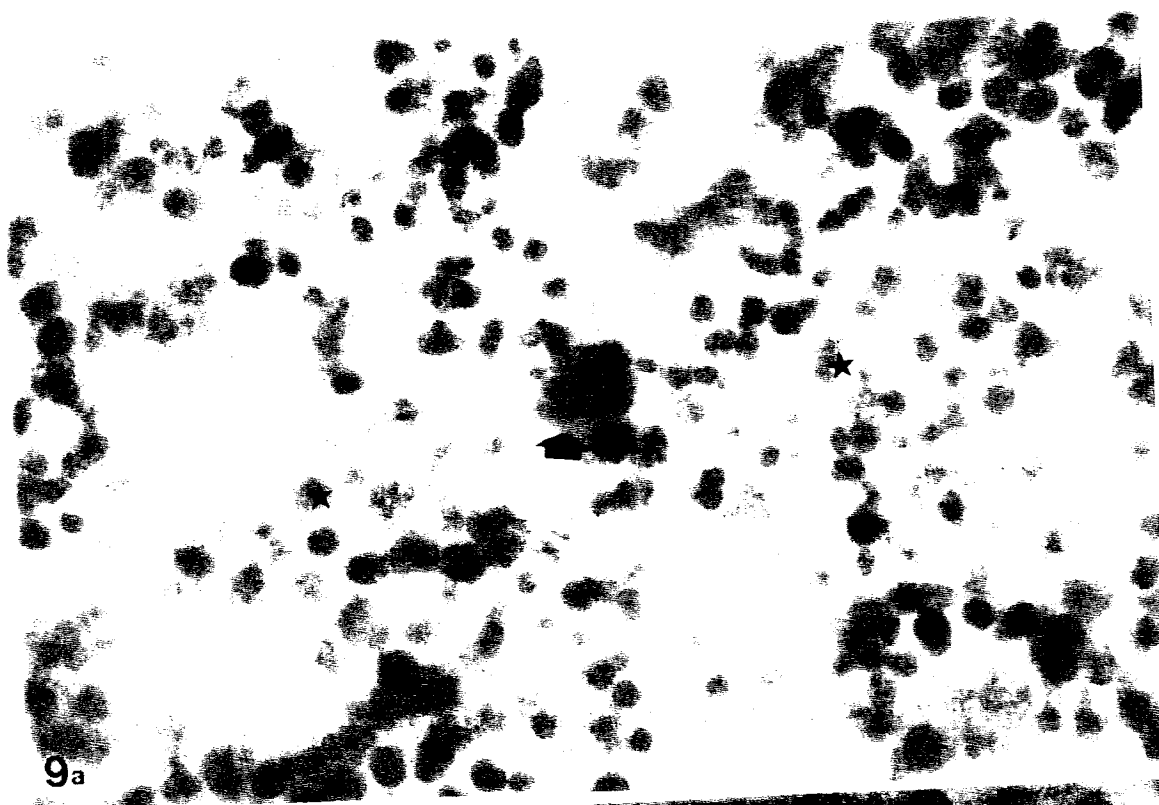


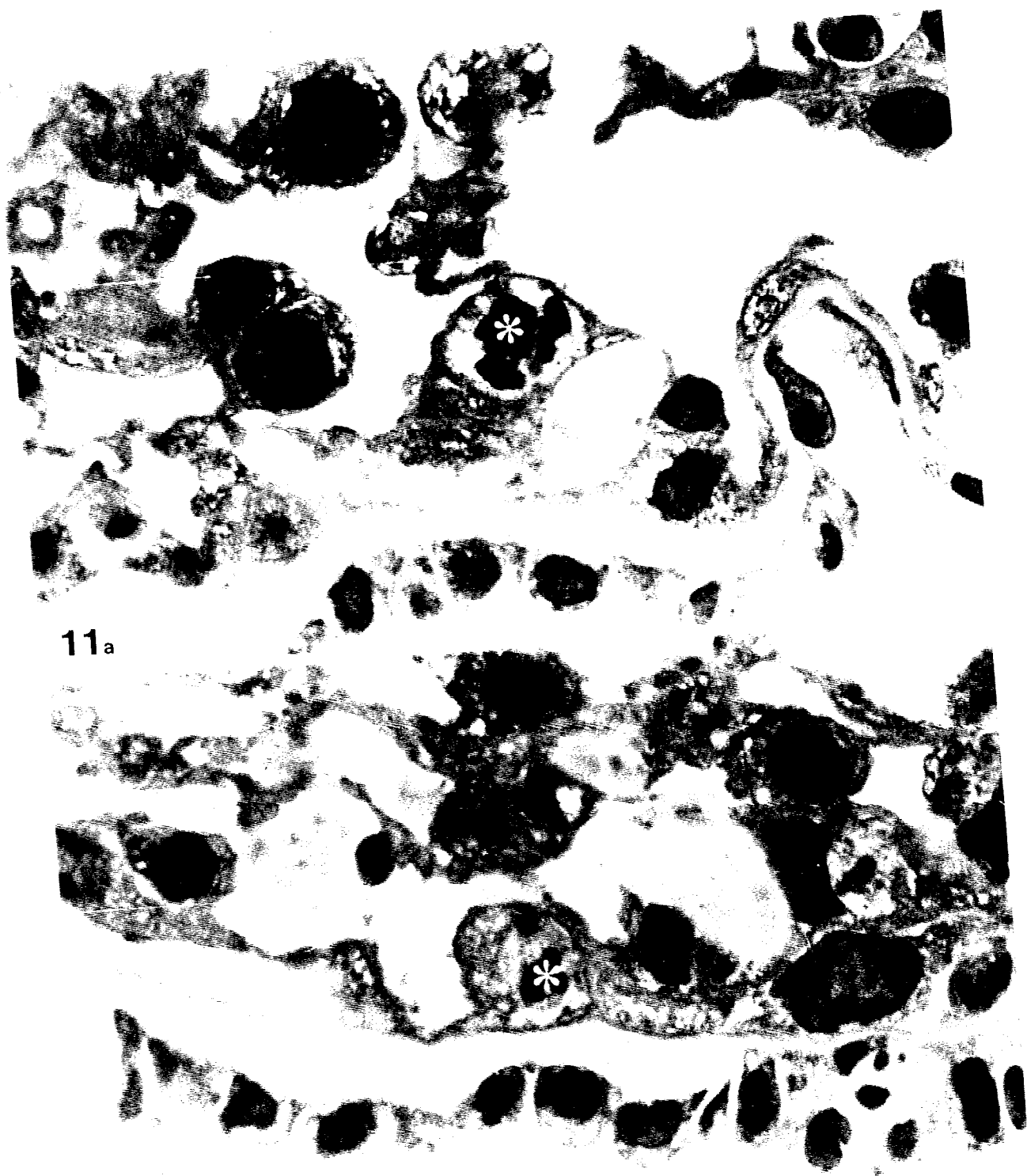
Figura 10: Animais com 25 a 27 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

10: Presença de parasitos (seta) na região dorsal do embrião (retro-abdominal). Imunohistoquímica evidenciada pela fosfatase alcalina revelada pelo *fast red*-naftol. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, 500X.



Figuras 11: Animais com 48 a 52 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

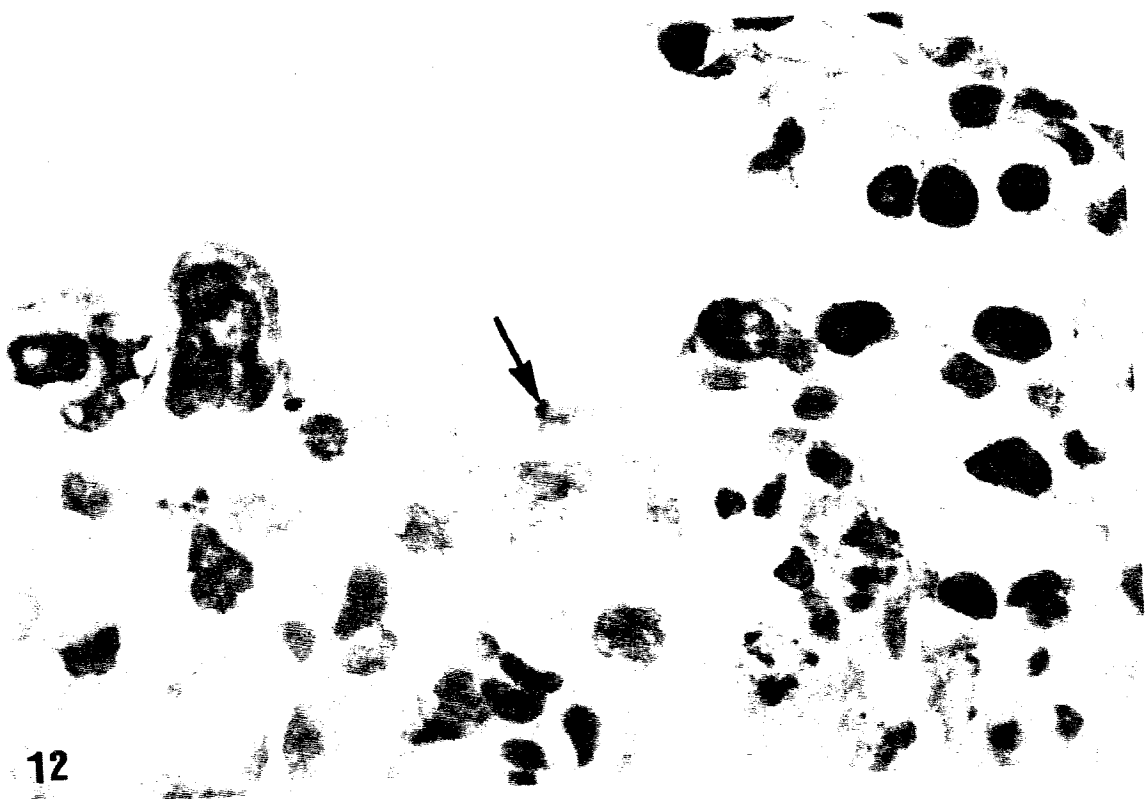
11a, b: Grupos de parasitos (asteriscos) no interior de célula do labirinto na placenta, próximos ao mesênquima. Observar o vacúolo parasitóforo cobrindo quase todo o citoplasma celular. Azul de Toluidina, 500X.



11b

Figura 12: Animais com 48 a 52 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

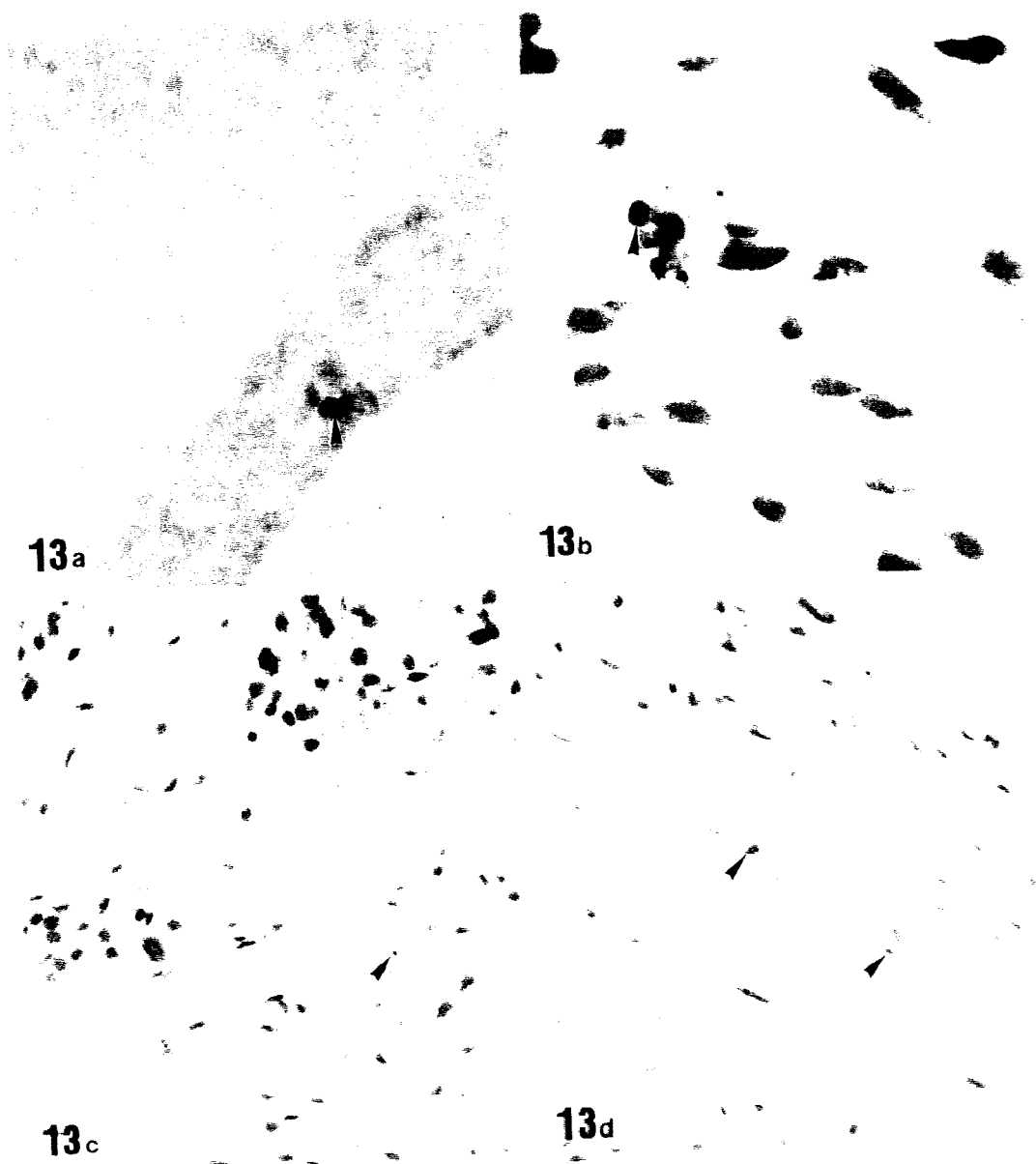
12: Presença de parasitos (seta) na região do labirinto da placenta. Observar o protozoário no interior da célula do labirinto. Imunohistoquímica evidenciada pela fosfatase alcalina revelada pelo *fast red*-naftol. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, 500X.



Figuras 13: Animais com 48 a 52 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

13a: Presença de parasitos (cabeça de seta) no interior de células do encéfalo fetal. Imunohistoquímica evidenciada pela fosfatase alcalina revelada pelo *fast red*-naftol. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, 500X.

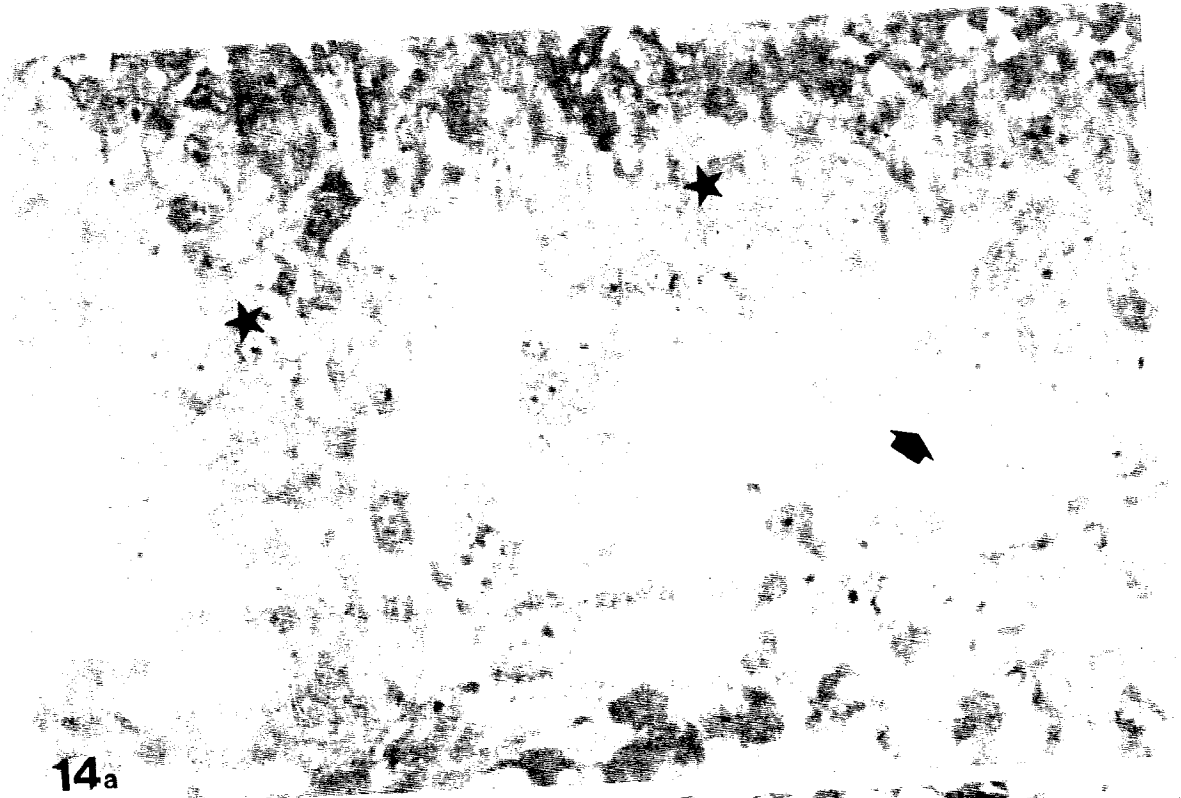
13b, c, d: Presença de parasitos (cabeças de setas) na região dorsal dos embriões (retro-abdominal). Observar que o parasito não se encontra no interior das células, mas no espaço existente entre elas. Imunohistoquímica evidenciada pela fosfatase alcalina revelada pelo *fast red*-naftol. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, **b:** 500X, **c e d:** 200X.



Figuras 14: Animais com 58 a 74 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

14a: Zona juncional da placenta mostrando espongiotrofoblastos (estrelas) e células gigantes (seta) sem infecção. Observar que não há presença nenhuma de parasitos no interior das células.

b: Região de labirinto da placenta mostrando ausência de parasitos no interior das células do labirinto (seta). **a-b:** Azul de Toluidina, 200X.



Figuras 15: Animais com 58 a 74 dias de infecção e de 17 a 20 dias de gestação

15a: Região de labirinto da placenta mostrando suas células (seta) sem infecção por parasitos. **b:** Área de encéfalo do embrião mostrando suas células ausentes de parasitos. **c:** Fígado do embrião evidenciando ausência de parasitos nas células hepáticas. **a-c:** Imunohistoquímica evidenciada pela fosfatase alcalina revelada pelo *fast red*-naftol. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, 200X.



15a

15b

15c

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; 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. **Infect. Immun.**, v. 72, nº 3, p. 1397-1401, 2004.

ARAUJO, F. G.; SLIFER, T. Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. **Infect. Immun.**, v. 71, nº 7, p. 4171-4174, 2003.

BEVERLY, J. K. A. Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. **Nature**, v. 183, p. 1348-1349, 1959.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 438-442, 2002.

BRAZ, L. M. A.; PIETRO, A. O.; NETO, V. A.; FRANÇA, F. O. S. Avaliação da eficácia da azitromicina e da pirimetamina, usadas isolada ou associadamente, no tratamento de infecção experimental de camundongos pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, nº 4, p. 401-403, 1999.

CAL, R. G. R.; MARRA, A. R.; LEWI, D. S.; WEY, S. B. Toxoplasmose pulmonar: ocorrência em adulto imunocompetente. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 49, n° 2, p. 133-134, 2003.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 421-428, 1999.

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

CHEMLA, C.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; HORNOY, P.; DUPOUY, D.; LEROUX, B.; BORY, J. P.; PINON, J. M. Preconceptional seroconversion and maternal seronegativity at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n° 2, p. 489-490, 2002.

CROY, B. A.; GUILBERT, L. J.; BROWNE, M. A.; GOUGH, N. M.; STINCHCO, M. B.; WEGMANN, T. G. Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. **J. Reprod. Immunol.**, v. 19, n° 2, p. 149-166, 1991.

DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. C. Qual é a recomendação atual para o tratamento da toxoplasmose congênita? **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, n° 1, p. 10, 2003.

DUBEY, J. P.; SHEN, S. K. Rat model of congenital toxoplasmosis. **Infect. Immun.**, v. 59, n° 9, p. 3301-3302, 1991.

DUBEY, J. P.; SHEN, S. K.; KNOK, O. C. H.; THULLIEZ, P. Toxoplasmosis in rats (*Ratus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. **Parasitology**, v. 115, p. 9-14, 1997.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n° 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; LEWIS, B.; BEAM, K.; ABBITT, B. Transplacental toxoplasmosis in a reindeer (*Rangifer tarandus*) fetus. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 131-135, 2002.

FATOOHI, A. F.; COZON, G. J. N.; WALLON, M.; KAHL, S.; GAY-ANDRIEU, F.; GREENLAND, T.; PEYRON, F. Cellular immunity to *Toxoplasma gondii* in congenitally infected newborns and immunocompetent infected hosts. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 181-184, 2003.

FAVORETO-Jr, S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 93, nº 1, p. 130-107, 1998.

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

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-Jr, 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. **Parasitol. Res.**, v. 85, p. 647-654, 1999.

FERRO, E. A. V. **Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus***. 2000. 147f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FERRO, E. A. V.; SILVA, D. A. O.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infect. Immun.**, v. 70, nº 12, p. 7098-7094, 2002.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 153, p. 2533-2543, 1994.

HIRAMOTO, R. M.; MAYRBAURL-BORGES, M.; GALISTEO-Jr, A. J.; MEIRELES, L. R.; MACRE, M. S.; ANDRADE-Jr, H. F. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Rev. Saúde. Pública.**, v. 35, nº 2, p. 113-118, 2001.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, v. 46, p. 11-21, 1960.

JOLLIE, W. P. Fine structural changes in the junctional zone of the rat placenta with increasing gestational age. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 12, nº 4, p. 420-438, 1965.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetric. Gynecol. Surv.**, v. 56, nº 5, p. 296-305, 2001.

KENNEDY, M. K.; PICHA, K. S.; SHANCHECK, K. D.; ANDERSON, D. M.; GRABSTEIN, K. H. Interleukin-12 regulates the proliferation of Th-1, but not Th-2 or Th-0, clones. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, nº 10, p. 2271-2278, 1994.

KIESCHNICK, H.; WAKEFIELD, T.; NARDUCCI, C. A.; BECKERS, C. *Toxoplasma gondii* attachment to host cell is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 12369-12377, 2001.

LETSCHER-BRU, V.; PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; FILISETTI, D.; ANTONI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. **Infect. Immun.**, v. 71, nº 11, p. 6615-6619, 2003.

LIMONGI, J. E. **Caracterização morfológica do desenvolvimento placentário de *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)**. 2002. 56f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2002.

LYCKE, E.; CARBERG, K.; NORRBY, R. Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host-cell: function of the penetration enhancing factor *Toxoplasma*. **Infect. Immun.**, v. 11, nº 4, p. 853-861, 1975.

MOMBRO, M.; PERATHONER, C.; LEONE, A.; BUTTAUFUOCO, V.; ZOTTL, C.; LIEVRE, M. A.; FABRIS, C. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection. **Eur. J. Pediatr.**, v. 162, p. 703-706, 2003.

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

NETO, V. A.; CAMPOS, R.; BARUZZI, R. G.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. v. X, São Paulo: SARVIER, 1982. 158p.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. Décima edição, São Paulo: ATHENEU, 2003. 428p.

NICOLLE, C.; MANCEUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Compt. Rend. Acad. Sci. Paris.**, v. 147, p. 763-766, 1908.

OKAY, T. S. **Etude de la kystogenese de *Toxoplasma gondii* chez le rat immunocompetent ou immunodeprime et dans un modele d'infection congenitable. Caracterisation genotypique de differentes souches et clones toxoplasmiques par amplification aleatoire**. 1994. 118f. Tese (Doutorado) – Faculté de Médecine de Grenoble de Université Joseph Fourier, Paris, 1994.

PASSOS, L. N.; ARAÚJO-FILHO, O. F.; ANDRADE-Jr, H. F. *Toxoplasma* encephalites in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 42, nº 3, p. 141-145, 2000.

PAULINO, J. P.; VITOR, R. W. A. Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holtzman rats. **Parasite**, v. 6, p. 63-66, 1999.

PEEL, S. Granulated metrial gland cells. **Adv. Anat. Embryol.**, v. 115, nº 1, p. 1-112, 1989.

PEREIRA, M. F.; SIVA, D. A. O.; FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R. Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 94, nº 1, p. 103-114, 1999.

REMLINGTON, J. S.; JABOBS, L.; MELTON, L. Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infection. **J. Infect. Dis.**, v. 108, nº 1, p. 163-173, 1961.

REY, L. **Parasitologia**. Terceira edição, Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S. A., 2001. 856p.

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**, v. 104, p. 19-23, 1992.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. Sexta edição, Barueri (São Paulo): MANOLE, 2003. 481p.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, v. 304, p. 248-253, 2004.

SILVA, L. A.; VIEIRA, R. S.; SERAFINI, L. N.; CARLOTTI-Jr, C. G.; FIGUEIREDO, J. F. C. Toxoplasmose do Sistema Nervoso Central em paciente sem evidência de imunossupressão: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, nº 5, p. 487-490, 2001.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che Ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. **Rev. Soc. Sci (São Paulo)**, v. 3, p. 109-112, 1908.

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

TAKAHASHI, E. E. H.; ROSSI, C. L. IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 39, n° 6, p. 327-331, 1997.

VILLAVEDRA, M.; CAROL, H.; NIETO, A. Evolution of IgG antibody response against *Toxoplasma gondii* tissue cyst in acute and chronic human infections. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 40, n° 2, p. 77-84, 1998.

ZUCKERMAN, F. A.; HEAD, J. R. Isolation and characterization of trophoblast from murine placenta. **Placenta**, v. 7, n° 4, p. 349-364, 1986.

