

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Mirian de Sylvio

**Análises das comparações bioquímicas no soro e exsudato
peritoneal de camundongos BALB/c inoculados com cepa
cistogênica e não cistogênica de
*Toxoplasma gondii***

Orientadora: Dr^a Ana Maria de Castro

Co-orientador: Dr. José Clecildo Barreto Bezerra

Colaboradora: Dr^a Marina Clare Vinaud

Dissertação de Mestrado

GOIÂNIA - 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Mirian de Sylvio

**Análises das comparações bioquímicas no soro e
exsudato peritoneal de camundongos BALB/c
inoculados com cepa cistogênica e não
cistogênica de *Toxoplasma gondii***

Orientadora: Dr^a Ana Maria de Castro

Co-orientador: Dr. José Clecildo Barreto Bezerra

Colaboradora: Dr^a Marina Clare Vinaud

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical, na área de concentração de Parasitologia.

GOIÂNIA - 2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

S585a Sylvio, Mirian de.
Análises das comparações bioquímicas no soro e exsudato peritoneal de camundongos BALB/c inoculados com cepa cistogênica e não cistogênica de *Toxoplasma gondii* [manuscrito] / Mirian de Sylvio. - 2009.
73 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Castro; Co-orientadores: Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra, Prof^a. Dr^a. Marina Clare Vinaud.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de abreviatura, figuras e tabelas.

1. Aspartato aminotransferases. 2. Fosfatase alcalina. 3. Lactato desidrogenase. 4. *Toxoplasma gondii*. I. Título.

CDU: 636.932.4:616-002.9

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por proporcionar esta oportunidade de crescimento e aprendizado e de estar comigo em todos os momentos da minha vida.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás por ter aberto as portas desta Instituição a minha pessoa.

A professora e orientadora desta dissertação Dr^a Ana Maria de Castro por ter me proporcionado essa oportunidade e por todo carinho e atenção.

Aos camundongos utilizados nos experimentos por ter dado suas vidas para o bem da ciência.

A todos os professores que ministraram disciplinas nessa unidade de ensino por ter compartilhado seus conhecimentos com todos nós enriquecendo mais nossa sabedoria.

A professora colaboradora Dr^a Marina Clare Vinaud por ter acompanhado com dedicação todos os procedimentos realizados neste laboratório de pesquisa, mostrando ter um bom espírito de corpo.

A todas as colegas do laboratório, Juliana Boaventura Avelar, Aline Almeida Barbaresco, Flávia Martins Nascente, Tatiane Luiza da Costa e Ana Cláudia Alves de Oliveira, pelo companheirismo, incentivos diários e apoio emocional fundamental nos momentos de dificuldade, obrigada.

Ao Hospital da Polícia Militar do Estado de Goiás, em especial ao meu chefe imediato Dr^o Sergio Henrique Nascente Costa por ter colaborado para a realização desse trabalho.

Por fim, aos meus filhos Gabriel Aurélio de Sylvio e Ruth Cristina de Sylvio e minha mãe Aparecida Constantino Vicente por terem me incentivado e me apoiado durante todo percurso da realização desse projeto de vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE ABREVIATURA	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	ix
I- INTRODUÇÃO - REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1- Epidemiologia	3
1.2- Ciclo evolutivo do <i>Toxoplasma gondii</i>	4
1.3- Formas evolutivas do <i>Toxoplasma gondii</i>	6
1.4- Mecanismos de transmissão	7
1.5- Patogênese da toxoplasmose	9
1.6- Enzimas de avaliação hepática	11
1.7- Diagnóstico laboratorial	17
1.10- Ensaio Bioquímicos	25
2- JUSTIFICATIVA	27
3- OBJETIVOS	28
3.1- Objetivo geral	29
3.2- Objetivos específicos	29

4- METODOLOGIA	29
4.1- Análises Bioquímicas-Testes Automatizados	33
4.2- Análises estatísticas	33
5- RESULTADOS e DISCUSSÃO	34
6- CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIATURA

- ANOVA** – Análise da variância
- A25** – Random Access Analyzer Clinical Chemistry
- AST** – Aspartato aminotransferases
- ALT** – Alanina aminotransferases
- CO₂** – Dióxido de carbono
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- ELISA** – Ensaio imuno enzimático
- ELFA** – Enzyme Linked fluorescent Assay
- FAL** – Fosfatase alcalina
- FR** – Fator reumatóide
- GGT** – Gamma – Glutamiltransferase
- H₂O** – Água
- HPLC** – Cromatografia líquida de alta performance
- IFI** – Reação de imunofluorescência indireta
- ISAGA** – Immunosorbent agglutination assay
- IPTSP** – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
- LDH** – Lactato desidrogenase
- MEIA** – Microparticle Enzyme Immunoassay
- NH₄⁺** – Amônia
- NAD**– Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- PAP** – Peroxidase - antiperoxidase
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- RNA** – Ácido ribonucléico
- SQR** – Substância química de referência
- UV** – Ultravioleta
- mL** – mililitros

LISTA DE FIGURA

Figura1: Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figura2: Forma infectante do T. gondii	6
Figura3: Cisto contendo bradizoítos.	6
Figura4: Oocisto	7
Figura 5: Aparelho demonstrativo para realização de metodologia automatizada A25 BioSystems®	26
Figura 6: Fluxograma da Metodologia	32
Figura 7: Concentrações de Uréia no soro de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa Rh e controles não infectados.	39
Figura 8: Concentrações de Creatinina no soro de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> cepa Rh e controles não infectados.	40
Figura 9: Concentrações da análise bioquímicas de Uréia no exsudato peritoneal de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa Rh e controles não infectados.	41
Figura 10: Concentrações da análise bioquímicas de creatinina no exsudato peritoneal de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa Rh e controles não infectados.	41
Figura 11: Concentrações da análise bioquímicas de Uréia no soro de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa ME-49 e controles não infectados.	47
Figura 12: Concentrações da análise bioquímicas de creatinina no soro de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa ME-49 e controles não infectados.	48
Figura 13: Concentrações da análise bioquímicas de Uréia no exsudato peritoneal de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa ME-49 e controles não infectados.	49
Figura 14: Concentrações da análise bioquímicas de creatinina no exsudato peritoneal de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa ME-49 e controles não infectados.	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Estratificação e caracterização das isoenzimas de Desidrogenase Láctica. **17**
- Tabela 2:** Concentrações das análises bioquímicas das enzimas AST, ALT, GGT, FAL e DHL do soro de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* (RH) e controle não infectados. **36**
- Tabela 3:** Concentrações das análises bioquímicas das enzimas AST, ALT, GGT, FAL e DHL do exsudado peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* (RH) e controle não infectados. **38**
- Tabela 4:** Concentrações das análises bioquímicas das enzimas AST, ALT, GGT, FAL e DHL do soro de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* ((ME- 49) e controle não infectados. **44**
- Tabela 5:** Concentrações das análises bioquímicas das enzimas AST, ALT, GGT, FAL e DHL do exsudato peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* ((ME- 49) e controle não infectados. **46**

RESUMO

A infecção pelo *Toxoplasma gondii* ocorre em todo o mundo, com prevalência de até 90% na população conforme seus hábitos culturais e condições socioeconômicas. As alterações fisiopatológicas provocadas por este parasito são muito estudadas nos indivíduos imunocomprometidos, nos casos de transmissão congênita, e nos indivíduos imunocompetentes a infecção é, geralmente, assintomática e pouco explorada pelos pesquisadores. Experimentalmente, os estudos seguem o padrão dos estudos humanos, e há pouca referência sobre as alterações bioquímicas (hepáticas e renais) no hospedeiro infectado pelo *T. gondii*. Este trabalho objetivou avaliar as alterações hepáticas e renais causadas por esse parasito em camundongos na fase aguda, usando a cepa não cistogênica (RH), e na fase crônica, com a cepa cistogênica (ME-49), tendo como controles camundongos sem infecção, somente submetidos ao estresse de inoculação com salina. Foram dosadas no soro e no exsudato peritoneal dos camundongos infectados e controles os níveis das enzimas Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Gamaglutamiltransferase (GGT), Fosfatase alcalina (FAL), desidrogenase láctica (DHL) e dos seguintes compostos: uréia e creatinina, por metodologia automatizada. As enzimas AST e ALT apresentaram diferença significativa no soro de camundongos infectados com cepa RH, demonstraram alterações em relação aos controles indicando uma destruição das células hepáticas. No exsudato peritoneal não foram demonstradas alterações em relação aos controles. A uréia e creatinina dosadas não demonstraram alteração significativa. A enzima lactato desidrogenase sérica apresentou alterações gradativas em todos os dias de infecção do camundongo no soro, já no exsudato peritoneal essa alteração foi evidenciada somente no quinto dia da infecção, mostrando que com o aumento de parasitos e a destruição celular causada por esse, essa enzima presente em várias células é responsável por demonstrar aumentos consideráveis. Todas as amostras de soro analisadas do grupo infectado com a cepa ME-49 demonstraram alterações durante todo período de acompanhamento. Enquanto que no exsudato peritoneal não mostrou nenhuma alteração durante todo período analisado. Houve aumento crescente na uréia em todos os dias de análises, porém, a creatinina não apresentou nenhuma alteração. A LDH mostrou-se alterada no soro em todos os dias de analisado. Conclui-se que a infecção pelo *T. gondii* pode provocar alterações hepáticas e renais ao longo do curso de infecção, tanto em infecções com cepa cistogênica quanto com cepa não cistogênica.

Palavras chave: Aspartato aminotransferases, Alanina aminotransferases, Gamaglutamiltransferase, Fosfatase alcalina, Lactato desidrogenase, Gama - GT, Uréia, Creatinina, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Infection with *Toxoplasma gondii* occurs throughout the globe, with a prevalence of up to 90% in the population. The physiological changes caused by this parasite are well studied in immunocompromised individuals and in cases of congenital transmission. In immunocompetent individuals the infection is usually asymptomatic and little explored by researchers. Experimental studies follow the pattern of human studies, and there few mention about the biochemical changes (liver and kidney metabolisms) in the host infected by *T. gondii*. This study aimed the quantification of hepatic and kidney alterations caused by acute infections by *T. gondii* (non cystogenic strain – RH) and by chronic infections (cystogenic strain – ME-49). The control group was formed by mice without infection, only submitted to saline stress. Several enzymes were measured in serum and peritoneal exudate of mice infected and control such as: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), urea, creatinine and lactate dehydrogenase, using an automated methodology. AST and ALT presented a significative difference in the serum of mice infected with RH strain when compared to controls indicating a destruction of liver cells. The peritoneal exudates did not present significative changes in relation to controls nor did the urea and creatinine levels. The séric lactate dehydrogenase showed gradual changes in all days of the infection in mice peritoneal exudates as early as this change was evident only in the fifth day of infection. All samples of the group infected with ME-49 strain showed changes in serum and peritoneal exudate during all days of analysis. Only ALT peritoneal exudates showed no change during all days of analysis. An increase in urea at all doses was observed, however, creatinine showed a change only within 120 days of infection. The LDH was altered in the serum in all days of analysis. In conclusion, the *T. gondii* infection may cause hepatic and kidney injuries either when caused by non-cystogenic as by cystogenic strains of the parasite.

Keywords: Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, glutamyltransferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, Gamma - GT, Urea, creatinine, *Toxoplasma gondii*.

1- INTRODUÇÃO - REVISÃO DA LITERATURA

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição cosmopolita, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, com altas taxas de infecção tanto em humanos quanto em animais de sangue quente que variam de acordo com hábitos culturais e condições econômicas das populações. Vários fatores, como o estado imunológico do hospedeiro, a virulência da cepa, o número de parasitos infectantes e a rota de infecção, atuam nas manifestações de sinais clínicos. Atualmente adotando-se métodos de caracterização molecular, evidenciou-se a existência de uma linhagem bem definida dentro da espécie *T. gondii* como cepa tipo I, II e III. Em camundongo, as cepas tipo I são altamente virulentas, enquanto as linhagens tipo II ou III são relativamente avirulentas (Howe & Sibley 1995). Cepa tipo I e II tem sido encontrada mais freqüentemente em humanos, enquanto em animais predomina a cepa tipo III, mas sendo também encontrada a linhagem II (Howe & Sibley 1995, Dubey et al. 2002a). No Brasil, o estudo de 25 isolados de *T. gondii*, a partir de galinhas assintomáticas provenientes de áreas rurais em torno da cidade de São Paulo, mostrou predominância de linhagem I, mas também da III em menor freqüência (Dubey et al. 2002b). Resultados similares (linhagens I e III) foram encontrados em isolados de gatos no estado do Pará levando a crer que estas duas cepas sejam as mais freqüentes no Brasil (Dubey et al. 2004).

T. gondii é um protozoário Coccídeo, parasito intracelular obrigatório, com ciclo biológico complexo e que acomete praticamente todas as espécies animais de sangue quente (Dubey & Beattie 1988). Normalmente *T. gondii* parasita seus hospedeiros sem a manifestação de sinais clínicos, porém é capaz de desencadear doença severa, principalmente na sua forma congênita ou quando infecta indivíduos imunodeprimidos (Dubey 1993). A importante via de transmissão para o ser humano é a ingestão de cistos viáveis, presentes em carnes de animais infectados, e que à linha de inspeção não são visualizados. Geralmente a ingestão desses cistos causa doença assintomática e nos casos sintomáticos pode desenvolver lesões severas oculares em pelo menos 2 a 3 % dos pacientes sintomáticos (Minho et al. 2004). Quando ocorre na ausência de resposta imune efetiva, causa doença devastadora no sistema nervoso central, como em fetos de mães com infecção aguda e em pacientes imunossuprimidos ou transplantados, levando à morte ou deixando seqüelas (Remington et al. 1995). Por se tratar de

uma doença assintomática a maioria das infecções agudas passa despercebida pelo paciente e pelo profissional da saúde, exceto em grupos de risco como gestantes ou imunossuprimidos, sendo que, a maioria dos pacientes não recebe terapêutica específica. A transmissão da infecção está relacionada com a presença do hospedeiro definitivo (felinos) no ambiente domiciliar, preservando o ciclo vital para esse parasito, envolvendo todos os animais de sangue quente como hospedeiro intermediário, que, a partir daí, chega ao hospedeiro definitivo, quando se completa o ciclo. Esses, após digerir a membrana dos cistos ou oocistos são infectados e produzem formas ambientais resistentes (oocistos), eliminando-os nas fezes durante as primeiras semanas da infecção. Os oocistos podem permanecer por meses ou anos no ambiente contaminando assim a água, vegetais e até outros hospedeiros completando o ciclo (Dubey 2006).

Wolf e Cowen 1939 descreveram a doença congênita causada pelo toxoplasma. Já em 1940, Pinkerton e Weinman relataram a toxoplasmose aguda em adultos. O grande avanço na epidemiologia da infecção, no entanto, só foi possível após a descoberta do teste sorológico que identifica a presença de anticorpos específicos no sangue dos animais infectados, o teste de Sabin e Feldman (1948) ou teste do corante, que muito contribuiu, através de inquéritos epidemiológicos para o reconhecimento do parasito como causa de infecção e doença em humanos.

Em 1965 Hutchinson foi o primeiro a reconhecer o papel do gato no ciclo evolutivo do parasito, mostrando que esses animais poderiam eliminá-lo pelas fezes. A verdadeira natureza do parasito permaneceu um mistério até que Frenkel e colaboradores (1970), estabeleceram que o parasito é um protozoário Coccídeo, que tem por hospedeiro definitivo o gato e existe em dois ciclos distintos: enteroepitelial em gatos e extra intestinal em tecidos de outros hospedeiros inclusive os felídeos. Hutchinson et al. em 1970 descreveram o oocisto como forma infectante do parasito.

A partir de 1981, com o aparecimento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a toxoplasmose teve a sua importância aumentada em virtude da possibilidade da reagudização, que pode acontecer nos indivíduos cronicamente infectados pelo protozoário, e da gravidade da forma reagudizada nesses pacientes,

tornando-se uma importante causa de morbidade e morte (Israelki & Remington 1988).

A prevalência de anticorpos compatíveis com infecções passadas varia em diferentes regiões geográficas conforme as variações climáticas e hábitos alimentares, fatores que somam para a prevalência do parasito em nosso meio. O aumento da soroprevalência de *T. gondii* tem sido observado em vários países como a França, onde o consumo de carne crua e/ou mal cozida, e a convivência com gatos que são numerosos, além do favorecimento do clima subtropical para a viabilidade do oocisto (Desmots & Couvreur 1974).

1.1- Epidemiologia

A toxoplasmose em sua forma latente (crônica) tem ampla distribuição mundial como tem sido demonstrado por vários inquéritos sorológicos entre populações humanas e de outros animais, sendo encontrada em todos os continentes, nos mais variados climas (Rey 2002). Sua prevalência esta estimada em 1 a 2 bilhões de pessoas, porém, a variabilidade da freqüência da infecção esta ligada a diversos fatores, tais como: padrões culturais da população, hábitos alimentares, idade, procedência rural ou urbana, entre outros (Amendoeira 2001). As menores prevalências têm sido encontradas em regiões muito frias ou muito áridas, onde a baixa densidade de felinos, aliada a menor sobrevivência dos oocistos no solo, diminuiu os índices de parasitismo de herbívoros, roedores e pássaros (Amendoeira et al. 2001).

Estima-se que 1/3 da população mundial possua anticorpos para *T. gondii*. Este valor aumenta com a idade do individuo, devido à oportunidade maior de adquirir a infecção (Hill & Dubey 2002). O Brasil apresenta índices que se encontram entre os mais elevados descritos, onde inquéritos sorológicos demonstram prevalências entre 37% e 91% (Ministério da saúde, 2006). Nos Estados Unidos e Reino Unido a prevalência estimada é de 16 a 40%, enquanto que nas Américas Central e do Sul e no Continente Europeu, a estimativa é de 50 a 80% (Tender et al. 2000, Jones et al. 2001). Em Taiwan, Lin e et al (2008) demonstraram uma positividade para toxoplasmose em mulheres grávidas indígenas e imigrantes de 40,6% (99/244) e 18,2% (33/188), respectivamente.

1.2- Ciclo evolutivo de *Toxoplasma gondii*

O ciclo vital do *T. gondii* compreende uma fase sexuada, que se dá no tecido enteroepitelial dos felídeos e resulta na produção de oocistos, e uma assexual, que pode ocorrer tanto nos tecidos de felídeos como de outros hospedeiros considerados intermediários, como aves e mamíferos, inclusive o homem (Figura 1), resultando na produção de cistos teciduais. (Dubey 1994). O parasito não apresenta especificidade por determinado órgão ou tecido e multiplica-se por divisão binária simples e endodiogênia sob as formas de taquizoítos e bradizoítos nos hospedeiros intermediários. Também apresenta as mesmas formas nos hospedeiros definitivos, observando-se ainda, a multiplicação sexuada onde após cinco estágios entéricos (trofozoíto e esquizontes) há diferenciação de gametas, fecundação e formação de um oocisto que será eliminado nas fezes não esporulado. A esporulação ocorrerá no meio externo dando origem no interior do oocisto, a dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada um. Tanto os taquizoítos como os bradizoítos e esporozoítos são infectantes para os animais susceptíveis.

Os seres humanos (homem e mulher), outros mamíferos e aves, funcionam como hospedeiros intermediários e podem adquirir a toxoplasmose ou se infectar ingerindo oocistos maduros encontrado no solo, verduras, água; carne mal cozida contendo cistos com bradizoítos ou taquizoítos livres encontrados, nos líquidos. Durante a fase aguda são encontradas formas proliferativas (taquizoítos) dentro de macrófagos ou nas circulações linfáticas ou sangüíneas e na fase crônica, cistos com bradizoítos são encontrados nos tecidos, podendo a mulher gestante transmitir ao feto formas de taquizoítos através da circulação placentária. Um gato jovem ou outros felídeos podem se infectar ao ingerir um animal albergando cistos teciduais contendo bradizoítos, oocistos maduros do solo ou macrófagos contendo taquizoítos, iniciando a fase coccidiana do ciclo que se processa nas células epiteliais do intestino delgado do felídeo. Inicialmente ocorre a liberação da forma infectante bradizoítos, esporozoítos ou taquizoítos que penetra nas células epiteliais, onde se iniciam a fase assexual do ciclo, denominada merogonia, com a formação inicial de um trofozoíto, a divisão nuclear e a formação dos merozoítos e a sua liberação para a luz intestinal. Os merozoítos liberados penetram em novas células epiteliais e inicia a fase sexuada do processo denominado gamogonia,

dividia em duas partes: os merozoítos que se transformam em macrogametócito jovem têm o desenvolvimento do seu citoplasma até a sua maturação em macrogametas, gameta feminino. A fusão de um microgameta com um macrogameta origina o zigoto e após a liberação da membrana cística transforma-se em oocisto maduro, esse oocisto são liberados para a luz intestinal e eliminados para o meio externo junto com as fezes do felídeo jovem infectado. No solo esse oocisto, por um processo de esporogonia origina os esporozoítos, dentro do oocisto, tornando infectante aos hospedeiros susceptíveis e contaminado solo, água e alimentos. Os hospedeiros susceptíveis também podem se infectar por meio da barreira placentária e transfusão sanguínea (Kawazoe 2005).

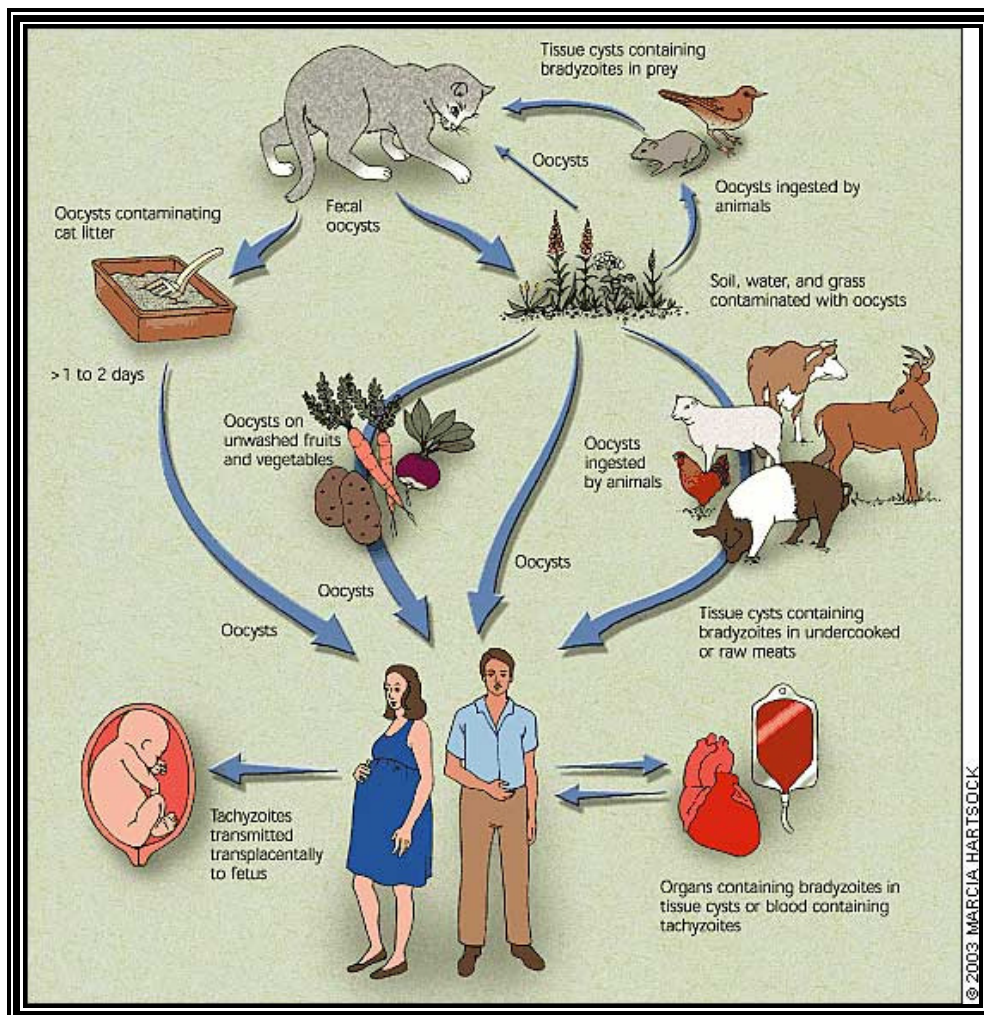


Figura 1: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. (www.antropozoonosi.it/.../Toxoplasmosi.htm)

1.3- Formas evolutivas de *Toxoplasma gondii*

Taquizoíto: É a forma encontrada durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada forma proliferativa, forma livre ou trofozoíto. Essa foi a primeira forma descrita dando o nome de (*toxon-arco*) devido a seu aspecto morfológico. Essa é uma forma móvel, de multiplicação rápida, por um processo denominado endodiogenia, ou seja, dentro da célula mãe ocorre a formação das células filhas. (Rey 2002, Kawazoe 2005).

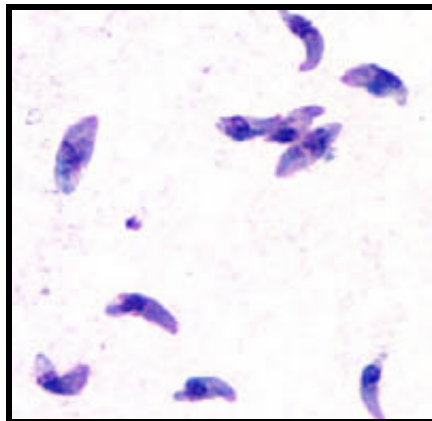


Figura 2: Taquizoítos (www.exopol.com/general/circulares/320.html)

Bradizoíto: As formas encontradas em vários tecidos (musculares esqueléticos e cardíacos, nervoso, retina), geralmente durante a fase crônica da infecção, sendo também denominada cistozoíto. Os bradizoítos são muito mais resistentes á tripsina e á pepsina do que os taquizoítos e podem permanecer viáveis nos tecidos por vários anos. Apesar de serem mais freqüentemente encontrados na fase crônica em algumas cepas os bradizoítos podem ser encontrados na fase aguda da infecção (Rey 2002, Kawazoe 2005).

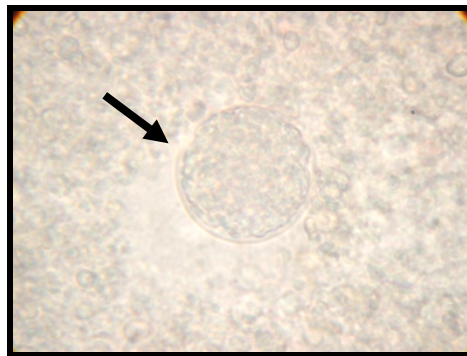


Figura 3: Cisto contendo bradizoítos/Lab de Protozoologia/IPTESP/UFG.

Oocistos: São as formas de resistência que possui uma parede dupla bastante resistente as condições do meio ambiente. Os oocistos são produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes e eliminados imaturos junto com as fezes. No meio ambiente eles sofrem esporulação contendo dois esporocistos, com quatro esporozoítos (Rey 2002, Dubey 2004, Kawazoe 2005).



Figura 4: Oocistos

(<http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2000/toxo/oocisto.html>)

1.4- Mecanismos de transmissão

A infecção pelo *T. gondii* constitui uma das zoonoses mais difundida no mundo. Em todos os países grande parte da população humana e animal apresentam parasitismo pelo *T. gondii*. Em algumas regiões 40 a 60 % dos adultos aparentemente saudáveis apresentam-se positivos para toxoplasmose, em testes sorológicos. Essas variações da prevalência parecem ser divididas a fatores geográficos, climáticos, hábitos alimentares tipo de trabalho, indicando que os mecanismos de transmissão devem ocorrer através de várias formas do parasito. As formas de transmissão da toxoplasmose conhecidas são: transmissão via oral, através da ingestão de água ou alimento contaminado com oocistos, pela ingestão de carne crua ou mal cozida, que contenham cistos viáveis de toxoplasma, e também por oocistos transmitidos no ar. Dubey et al 1991 e Dubey em 2004 afirmaram que existem evidências que demonstram que infecções induzidas por oocistos, em humanos, são mais severas do que aquelas provocadas por cistos teciduais.

Assim os seres humanos adquirem a infecção por três vias principais:

- Ingestão de oocisto presente em alimento ou água contaminada, jardins, caixa de areia, lata de lixo ou veiculado mecanicamente por moscas e insetos.
- Ingestão de cistos encontrados em carne crua ou mal cozida, especialmente do porco e do carneiro. Os cistos resistem por semanas ao frio, mas o congelamento a -12°C ou aquecimento acima de 67°C tornam inviáveis.
- Congênita ou transplacentária: o risco de transmissão uterina aumenta de 14% no primeiro trimestre da gestação, após a infecção materna primária, até 59% no último trimestre da gestação. É interessante esclarecer que as mulheres que apresentam sorologia positiva antes da gravidez têm menos chance de infectar seus fetos, do que aquelas que apresentam a primo-infestação durante a gestação.

Mais raramente pode ocorrer ingestão de taquizoítos em leite contaminado ou salivas, acidentes de laboratório, transmissão por transplante de órgãos infectados. Na Austrália durante um coquetel em Queensland, um surto de toxoplasmose aguda aconteceu após o consumo de carne de canguru e de cordeiro cru e que não haviam sofrido o tratamento térmico adequado (Dias & Freire 2005).

O solo tem sido considerado, em algumas regiões, como uma importante fonte de infecção por *T. gondii*, por meio de oocistos (Spalding et al. 2005).

A água também pode ser uma via de transmissão para a toxoplasmose, atuando como um disseminador de oocistos para a população que venha a utilizá-la. A contaminação de reservatórios municipais de água, por fezes de felinos infectados e eliminando oocistos de *T. gondii*, pode levar a surtos ou epidemias, envolvendo uma cidade ou mesmo uma região (FUNASA 2002).

Dubey em 2006 documentou um surto de toxoplasmose por meio de oocistos disseminados no ar, em estábulo em Atlanta, quando 37 pessoas contraíram a toxoplasmose aguda.

Em 2003, Bahia – Oliveira et al relataram a importância da água como fator epidemiológico relevante na cidade do Rio de Janeiro quando foi mostrado à correlação entre o consumo de água não tratada com o aumento da prevalência de toxoplasmose em bairros mais pobres.

Sobral et al em 2005 ao analisarem agrupamento indígena também encontraram forte correlação com a água, ao verificar a existência de alta concentração de felídeos selvagem próximo às margens das fontes de água utilizadas por estes índios.

1.5- Patogênese da toxoplasmose

O *T. gondii* é um importante agente patogênico que pode causar doença sistêmica e ocular em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes. A toxoplasmose pode ser uma doença agressiva e freqüentemente fulminante em indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), causando infecção do sistema nervoso central, infecção visceral e dos nódulos linfáticos. Em indivíduos imunocompetentes a infecção apresenta um quadro assintomático, que após a fase

aguda ainda permanece a infecção pela forma cística do parasito caracterizando a infecção crônica (Weber et al. 2005).

Os taquizoítos penetram ativamente ou são fagocitados por células do hospedeiro, multiplicando-se em vacúolos fagocítico, onde impedem a fusão dos lisossomas, conseguindo assim sobreviver e destruir a célula parasitada durante a fase aguda. Nesta fase, parece haver uma excessiva produção de mediadores de inflamação aguda, sugerindo que a infecção, seja causada parcialmente pela a ativação do sistema imunológico do hospedeiro. Em poucos dias desenvolve-se a resposta imune adaptativa do hospedeiro que em cerca de duas semanas atinge sua maior eficácia, tornando duradoura daí em diante (Hinrichsen et al. 2005).

Na fase crônica, em indivíduos imunocompetentes, os cistos nos tecidos não têm maior importância na patogenia da toxoplasmose, já que no caso de se romperem, originam reação inflamatória localizada, e os bradizoítos por ventura liberados serão rapidamente destruídos pela resposta imune do hospedeiro. Uma exceção seria no caso de cisto rompido estar localizado na retina, quando mínima reação inflamatória pode ter repercussão sobre a visão. Outra exceção seria a eventual ruptura do cisto em indivíduo imunocomprometidos, acarretando a reagudização da toxoplasmose. Fatores relacionados à virulência do parasito e a resistência do hospedeiro influenciam o curso da infecção (Su et al. 2002; Suzuki 2002).

A toxoplasmose adquirida após o nascimento pode apresentar uma evolução variável, e na espécie humana parece estar ligada a alguns fatores importantes, como cepa do parasito, resistência da pessoa e modo de infecção (Amendoeira 2001, Spalding et al. 2003). Entretanto, a transmissão congênita é freqüentemente a mais grave (Coutinho & Vergara 2005). Alguns experimentos realizados com *T. gondii* oriundos de casos humanos e inoculados em animais de laboratórios comprovam este fato: há cepas que levam a cobaia à morte (camundongos, hamster, ratos, coelhos, cobaias) em poucos dias, outras apenas provocam emagrecimento, anemia, queda de pêlo com posterior estabelecimento do animal (Kawazoe 2005).

Toxoplasmose congênita ou Pré-natal

Para que se instale uma toxoplasmose congênita é necessário que a mãe esteja na fase aguda da doença ou tenha havido uma reagudização da mesma durante a gravidez. As conseqüências da toxoplasmose materna para o feto dependerão do grau de exposição do feto as formas evolutivas infectantes a virulência da cepa, a capacidade dos anticorpos maternos protegerem o feto e também do período de gestação. Assim sendo, as gestantes na fase aguda (ou reagudizada) da doença pode abortar o feto, produzir partos precoces ou atermos, dando origem a crianças sadias ou apresentando anomalias graves e até mesmo levar à morte. Outros 10% a 23% de fetos infectados durante a gravidez podem mostrar sinais de toxoplasmose clínica ao nascimento (Camargo 2001; Kawazoe et al. 2005).

Toxoplasmose pós-natal

Dependendo da virulência da cepa, estado de imunidade da pessoa e outras causas mais, a toxoplasmose pós-natal pode apresentar desde casos benignos ou assintomáticos (a grande maioria) até casos de morte. Entre esses dois extremos, há uma variada gama de situações, dependendo da localização do parasito: podendo ser ganglionar, que é a forma mais freqüente encontrada tanto em crianças como em adultos; ocular (retinocoroidite) lesão mais freqüente associada à toxoplasmose; cutânea ou exantemática, raramente encontrada.

Os casos conhecidos foram de evolução rápida e fatal. A meningoencefalite é pouco freqüente em indivíduos imunocompetentes, porém com o surgimento da AIDS, a freqüência aumentou consideravelmente, em decorrência da reativação de formas císticas encontradas em indivíduos com infecções latentes. Esse risco para indivíduos imunodeficientes com sorologia positiva para toxoplasmose é estimado em 25% a 26% dependendo da região geográfica onde habitam (Rey 2002; Kawazoe 2005).

Toxoplasmose em imunocomprometidos

Contrastando com a infecção de indivíduos imunocomprometidos, a doença é extremamente grave. A infecção crônica é totalmente assintomática assumem subitamente caráter agudo e passam a dominar em doentes que venha a sofrer depressão imunológica de etiologia diversa, ou em conseqüência de terapia

imunodepressora. Com a pandemia de HIV, a partir dos anos 80, a situação tornou-se freqüente, pois a toxoplasmose vem ocupando um lugar de destaque como causa de óbito por infecções oportunista nesses pacientes. Na maioria dos casos desenvolve-se um quadro clínico de encefalite aguda, que leva a óbito em poucos dias, outras vezes a evolução é prolongada (Rey 2002)

1.6- Enzimas de avaliação hepática

Testes bioquímicos que demonstrem o grau de comprometimento hepático associado aos dados sorológicos permitem uma caracterização mais rápida do quadro clínico, facilitando tanto o diagnóstico da enfermidade quanto o prognóstico dos animais (Hagiwara 2004).

Os aminoácidos provenientes do catabolismo protéico são desaminados com a produção de amônia. Como esse composto é potencialmente tóxico, é convertido em uréia no fígado associado ao CO_2 . A uréia constitui 45% do nitrogênio não protéico no sangue. Após a síntese hepática, a uréia é transportada pelo plasma até os rins, onde é filtrada pelos glomérulos. A uréia é excretada na urina, embora 40 – 70% sejam reabsorvidas por difusão passiva pelos túbulos. Um quarto da uréia é metabolizado no intestino para formar amônia e CO_2 pela ação da flora bacteriana normal. Essa amônia é absorvida e levada ao fígado onde é reconvertida em uréia. Os níveis de uréia no plasma são afetados pela função renal, conteúdo protéico da dieta, catabolismo protéico, estado de hidratação do indivíduo e presença de sangramento intestinal. Apesar dessas limitações, entretanto, o nível de uréia ainda serve como um índice de previsão da insuficiência renal sintomática e no estabelecimento de diagnóstico na distinção entre várias causas de insuficiência renal (Stryer 1992).

Enfermidades renais com diferentes tipos de lesões (glomerular, tubular, intersticial ou vascular) causam o aumento dos teores de uréia plasmática. A utilidade da uréia como indicador de função renal está limitado pela variabilidade da sua concentração plasmática como consequência de fatores não renais (Steven & Scott 2002).

A proteína é um componente estrutural e funcional de ordem prioritária ao corpo, por exemplo, enzimas e hormônios, receptores e transportadores celulares, musculatura esquelética e articulações, composição da epiderme, entre outros

componentes e funções orgânicas vitais. Desta forma, os aminoácidos são as unidades básicas que constituem estas proteínas, de modo que fontes dietéticas adequadas são essenciais para manter integridade e funções celulares, conseqüentemente, a saúde. O aspecto mais relevante das proteínas correlaciona-se com sua composição em aminoácidos, a qual define sua estrutura e função orgânica, e em termos nutricionais, a possibilidade de digestão e metabolismo (Lehminge 2000; Swenson & Reece 1996).

Durante a síntese e degradação normais das proteínas celulares (renovação das proteínas) alguns dos aminoácidos liberados sofrem degradação oxidativa, caso não sejam necessários para a síntese de novas proteínas.

O excedente de aminoácidos é catabolizado, devido ao organismo não poder armazenar estes na forma livre, ou tanto no jejum severo quanto no diabetes melitus, pois respectivamente, os carboidratos estão inacessíveis para produção de energia ou não são utilizadas adequadamente, assim, as proteínas corporais são utilizadas para atender as exigências energéticas, através da mobilização metabólica de aminoácidos glicogênicos e/ou cetogênicos (Lehninger et al. 2000; Swenson & Reece 1996).

Em todas essas circunstâncias metabólicas, os aminoácidos perdem seus grupos amino e os α -cetoácidos formados, sofrem oxidação até CO_2 e H_2O . Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos fornecem unidades de carbono, que são convertidas em glicose ou corpos cetônicos, para suprir as necessidades energéticas do cérebro, dos músculos e outros tecidos. As vias de degradação dos aminoácidos são similares na maioria dos organismos. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos, em geral, encaminham-se para o ciclo de ácido cítrico denominado metabolismo intermediário (Lehninger et al. 2000).

Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

As enzimas AST e ALT catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o α -cetoglutarato, formando cetoácidos e ácidos glutâmicos. As reações catalisadas pelas aminotransferase exercem papéis centrais tanto na síntese como na degradação de aminoácidos. Além disso, como essas reações envolvem a interconversão dos aminoácidos a piruvato ou ácidos dicarboxílicos, elas

atuam como uma ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos (Lehninger et al. 2000).

As aminotransferases estão amplamente distribuídas nos tecidos humanos. As atividades mais elevadas de AST encontram-se no miocárdio, fígado, músculo esquelético, com pequena quantidade nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos (Motta 2003).

A AST, que catalisa a transaminação de L-aspartato e alfa-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato, é encontrada em quase todos os tecidos, logo, a atividade sérica de AST não é específica para nenhum tecido, mas o músculo e o fígado podem ser considerados as maiores fontes (Câmara et al. 2007).

A AST e ALT são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas enzimas para a circulação. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST estão presentes na mitocôndria. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática (ALT), enquanto, em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial (AST), elevando a relação AST/ALT.

Várias desordens podem levar a alteração da AST, tais como: Hepatites, Cirroses, Colestases, Pancreatites, podendo mostrar pequenas alterações nas gangrenas, esmagamento muscular, enfermidade hemolítica, distrofia muscular progressiva, inflamação dos ductos biliares e infecção por parasitas (Lassen 2004a).

Gama – Glutamiltranspeptidase (GGT)

A Gama – glutamiltranspeptidase (GGT) catalisa a transferência de um grupo γ -glutamil de um peptídeo para outro peptídeo ou para um aminoácido produzindo aminoácidos gama – glutamil cistenilglicina. A GGT está envolvida no transporte de aminoácidos e peptídeos através das membranas celulares, na síntese protéica e na regulação dos níveis de glutatião tecidual. Essa enzima pode ser encontrada no fígado, vias biliares, rim, intestino, próstata, pâncreas, pulmões, cérebro e coração (Emanuelli et al. 2008).

A GGT é uma enzima que, embora tenha maior concentração no tecido renal, tem sua importância clínica ligada às doenças do fígado e vias biliares (colestase e lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas, principalmente). Esta enzima é encontrada no interior dos hepatócitos e nas células epiteliais biliares, sendo considerada marcadora de lesão hepatobiliar de alta sensibilidade, mas, de pouca especificidade, uma vez que pode estar alterada por uso de medicações, álcool e várias doenças sistêmicas. Alguns estudos sugerem forte relação da GGT com aumento do índice de massa corpórea (IMC), sugerindo que o peso corporal, mais do que o álcool, pode ser o fator principal da elevação dos níveis séricos das enzimas hepáticas (Araujo et al. 2005). Em 2000 Rantala et al mostraram que existe associação da GGT com as diversas morbidades da síndrome metabólica (SM), condição esta que é caracterizada por resistência à insulina, diabetes Mellitus ou glicemia de jejum alterada, hipertensão, dislipidemia, obesidade abdominal, estado pró-trombótico e pré-inflamatório, fatores estes que predispõem as doenças cardiovasculares e aterosclerose.

Fosfatase Alcalina

A Fosfatase Alcalina (FAL) pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas, que catalisam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino. Essa enzima está amplamente distribuída nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos), leucócitos e placenta. A forma predominante no soro em adultos normais origina-se, principalmente, do fígado e esqueleto. Apesar da exata função metabólica da enzima ser desconhecida, parece estar associada com o transporte lipídico no intestino e com processo de calcificação óssea (Motta 2003). No fígado, a fosfatase alcalina está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parênquimais aos canalículos biliares (Motta 2003).

Como a Fosfatase alcalina está localizada nas membranas de revestimentos dos canalículos biliares, a enzima está elevada nas desordens do trato biliar. Pelo impedimento do fluxo biliar, a FAL sérica atinge 2 – 3 vezes os valores de referência (podendo chegar a 10 – 15 vezes), dependendo do grau de estase biliar. Esses aumentos são devidos, fundamentalmente, ao: incremento na síntese da enzima,

retenção de ácidos biliares no fígado, que solubilizam a fosfatase alcalina e a removem da membrana plasmática dos hepatócitos e regurgitação da enzima para a circulação pelo impedimento da excreção. O aumento dessa enzima está com frequência em lesões expansivas (carcinoma hepatocelular, metástases, granuloma), Hepatites virais e cirrose, doença óssea (Osteomalácia e raquitismo, tumores ósseos) (Motta 2003).

Creatinina

A creatinina é produzida como resultado da desidratação não enzimática da creatina muscular. A creatina, por sua vez, é sintetizada no fígado, rim e pâncreas e é transportada para as células musculares e cérebro, onde é fosforilada a creatina - fosfato (substância que atua como reservatório de energia). Tanto a creatina - fosfato como a creatina, em condições fisiológicas, espontaneamente, perde o ácido fosfórico ou água, respectivamente, para formar seu anidrido, a creatinina. A creatinina livre não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona somente como um produto dos resíduos de creatina. A creatinina difunde do músculo para o plasma de onde é removida quase inteiramente e em velocidade relativamente constante por filtração glomerular. A quantidade de creatinina excretada diariamente é proporcional a massa muscular e não é afetada pela dieta, idade, sexo, ou exercício e corresponde a 2% das reservas corpóreas de creatina fosfato. Como a velocidade de excreção é relativamente constante e a sua proporção não é influenciada pelo metabolismo protéico ou outros fatores externos, a concentração da creatinina sérica é uma excelente medida para avaliar a função renal. Os teores de creatinina sérica são mais sensíveis e específicos do que a medida da concentração de uréia plasmática no estudo da velocidade e filtração glomerular reduzida. (Emanuelli et al. 2008).

Qualquer condição que reduz a velocidade de filtração glomerular promove uma menor excreção urinária de creatinina, com o conseqüente aumento nas concentrações plasmática da mesma. A concentração da creatinina sérica aumenta quando ocorre a formação ou excreção reduzida de urina e independente de causa pré-renal, renal ou pós - renal. Valores aumentados indicam a deterioração da função renal, sendo que o nível sérico geralmente acompanha, paralelamente, a severidade da enfermidade. Os níveis de creatinina muitas vezes não ultrapassam

os limites de referência até que 50 – 70% da função renal estejam comprometidas. Portanto, teores dentro da faixa de referência não implicam necessariamente função renal normal (Emanuelli et al. 2008).

Lactato desidrogenase (DHL)

A Lactato desidrogenase é uma enzima da classe das oxidoredutases que catalisa a oxidação reversível do lactato a piruvato, em presença da coenzima NAD⁺ que atua como doador ou aceptor de hidrogênio.

A DHL está presente no citoplasma de todas as células do organismo. Sendo em maior quantidade no miocárdio, fígado, músculo esquelético, rim e eritrócitos. Os níveis teciduais do DHL são aproximadamente 500 vezes maiores do que os encontrados no soro e lesões naqueles tecidos provocam elevações plasmáticas significativas dessas enzimas. Devido à presença de DHL em vários tecidos o aumento dos teores séricos da mesma é um achado inespecífico. É possível obter informações de maior significado clínico pela separação DHL em cinco frações isoenzimáticas. As isoenzimas de DHL são designadas de acordo com sua mobilidade eletroforética. Cada isoenzima é um tetrâmero formado por quatro subunidades chamadas de H para a cadeia polipeptídica cardíaca e M para a cadeia polipeptídica muscular esquelética. As cinco isoenzimas encontradas no soro são classificadas de acordo com a combinação dessas cadeias, como demonstrado na Tabela I (Motta 2003).

A DHL, que catalisa a reação reversível de L-lactato para piruvato, em condições de anaerobiose, está presente em grandes quantidades na musculatura esquelética, mas o aumento da atividade sérica dessa enzima não é específico para lesão muscular (Lassen 2004).

Tabela 1: Estratificação e caracterização das enzimas de Desidrogenase láctica

Tipo	%	Localização
LD - 1 (HHHH)	14 - 26	Miocárdio e eritrócitos
LD - 2 (HHHM)	29 - 39	Miocárdio e eritrócitos
LD - 3 (HHMM)	20 - 26	Pulmão, baço, pâncreas e linfócitos
LD - 4 (HMMM)	8 - 16	Fígado e Músculo esquelético
LD - 5 (MMMM)	6 - 16	Fígado e Músculo esquelético

Fonte: Princípios e Interpretações de Bioquímica Clínica, 2003.

1.9- Diagnóstico laboratorial

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito por meio de testes sorológicos. Segundo as características desses anticorpos, diferentes marcadores sorológicos, têm sido descritos para distinguir entre infecção latente, comum na população, e infecção aguda (recente), crônica e/ou a reagudização (Contreras et al. 2000). Outras respostas se esperam, também, da sorologia da toxoplasmose, como verificar na gestante seu contágio pelo toxoplasma ou, no paciente imunocomprometido, a reagudização. Por tais interrogações, a sorologia da toxoplasmose apresenta-se como uma das mais complexas, em contínua evolução, exigindo uma variedade de testes e experiência do responsável pela realização e interpretação dos resultados. Entretanto, a evidenciação do parasito, por isolamento a partir do material do paciente, ou pela demonstração de seus componentes, como antígenos ou segmentos do DNA, é de alto valor diagnóstico, especialmente nos imunocomprometidos, seja por imunodepressão ou por imuno imaturidade como no feto e no recém-nascido. Os métodos mais frequentes usados para o diagnóstico de toxoplasmose são os imunológicos. Os exames parasitológicos e moleculares (PCR) possuem indicação específica, utilizado com maior freqüência em pesquisas (Camargo 2000).

Diagnóstico Parasitológico de *Toxoplasma gondii*

A pesquisa do parasito e de suas moléculas pode ser feita por: inoculação em camundongo, isolamento em cultura de células, pesquisa de antígenos no soro, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Inoculação em camundongo

Utiliza o sangue do paciente, de preferência a camada leucocitária, ou sedimento do centrifugado de líquido cefalorraquiano, líquido amniótico, lavado brônquico-alveolar, suspensões de triturados de biópsia ou de placenta, que são inoculados por via intraperitoneal em camundongos isogênicos (Remington; Thulliez & Montoya 2004). A positividade é indicada pela soroconversão do animal e confirmada pelo achado de taquizoítas no líquido peritoneal ou, mais freqüentemente, de microcistos no cérebro e outros órgãos, evidenciados em cortes de tecido por imunohistoquímica, o que, entretanto, pode exigir passagens “cegas” para novos camundongos, inoculados com triturados de órgãos do primeiro. Os prazos longos para a obtenção de resultados, de 30 ou mais dias, são compensados pela alta especificidade do teste (Camargo 2000).

Dentre os animais sensíveis à inoculação, citam-se os hamsters, cobaias, camundongos e coelhos. Desses, os camundongos são os mais susceptíveis à infecção por inoculação peritoneal, podendo fornecer milhões de taquizoítos por mL de exsudato em até 3 dias. Uma vez isolada, a cepa de *T. gondii* pode ser mantida para fins experimentais mediante a reinoculação em camundongos (Calvão 2002). Entretanto a criopreservação *in vitro* tem sido um método prático para se evitar a perda da cepa e o uso abusivo de camundongos, quanto à necessidade constante de inoculações que despendem tempo, material e pessoal técnico treinado. Assim taquizoítos podem ser mantidos sem perdas da viabilidade e virulência, entre -20°C e -60°C por oito semanas, a -70°C por 200 dias e em nitrogênio líquido -196°C por tempo indeterminado. A sobrevivência dos camundongos infectados é curta, entre 4 a 10 dias, dependendo da cepa e da quantidade de material inoculado, ocorrendo acometimento visceral com lesões necróticas, podendo desenvolver cistos teciduais na musculatura e encéfalo. Com os materiais obtidos dos camundongos infectados experimentalmente pode-se preparar esfregaços a serem corados pelo *Giemsa* e

com material de biópsia, fazem-se os cortes histológicos e coloração pela hematoxilina-eosina-HE. O diagnóstico desta zoonose pode ser realizado pela pesquisa direta de cistos e taquizoítas em tecidos de camundongos, através de cortes histológicos, seja corado pela HE, seja pela Imunohistoquímica-IH (Rosa et al. 2001). Em cortes histológicos corados pela HE pode ser difícil a identificação do *T. gondii*, pois o parasito não possui características tintoriais próprias que permitam distingui-lo nitidamente das células adjacentes, podendo ser confundido com núcleos ou fragmentos nucleares que se coram de forma semelhante. Os cortes histológicos, como as demais de pesquisa direta do parasito, exige grande experiência do observador, análise de vários cortes e/ou lâminas, que dificultam a sua utilização na rotina, apesar da boa sensibilidade (Tsunematsu et al. 1964).

Cultura de Células

Os materiais suspeitos são semeados em culturas de células, como fibroblastos humanos ou outras linhagens celulares. O desenvolvimento dos toxoplasmas no interior das células pode ser evidenciado com facilidade por imunofluorescência no tecido em prazos curtos, de até uma semana. Porém, essa técnica é menos sensível do que a inoculação no camundongo (Derourin et al. 1987, Meirelles 2001).

Pesquisa de antígenos

O material antigênico do toxoplasma, bem como complexos imunes parasitários, pode ser detectado no soro na fase aguda da toxoplasmose (Van Knapen et al. 1985). O parasito ou seus antígenos podem ser evidenciados em cortes de tecidos por imuno-histoquímica, utilizando-se anticorpos específicos e coloração imunofluorescente ou imunoenzimática. (Sternberger & Hardy 1970). Essa técnica vem sendo usada no diagnóstico pós-morte de diversos agentes infecciosos, particularmente do *T. gondii* (Conley & Jenkins 2001).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Durante os últimos 15 anos, o diagnóstico de agentes infecciosos inclui o uso de tecnologia que envolve os ácidos nucleicos. O diagnóstico de organismos parasitários é o último campo da biologia clínica que incorporou essas técnicas, devido aos custos altos dos ensaios de biologia molecular e às baixas prevalências dessas infecções em países que estão na vanguarda da biotecnologia. A presença do parasito pode ser demonstrada através de seus componentes antigênicos ou de segmentos de DNA. Em 1985, foi descrita a estratégia para se amplificar um alvo genômico mediante a replicação do DNA *in vitro* (Saiki et al. 1985). O ensaio da PCR é uma técnica utilizada em testes clínicos para detecção de alterações genéticas ou infecções por diferentes agentes etiológicos (Ellis, 1998). Estudos sobre o genoma do *T. gondii* tornaram possível a utilização da PCR para a detecção do parasito (Bastien 2002). Amostras de sangue testadas para se investigar parasitemia por ensaios de PCR, amplificando-se segmentos dos genes B1 e P30 de *T. gondii*, mostraram o potencial da técnica para o diagnóstico não-invasivo da toxoplasmose disseminada (Spalding et al. 2003). Diferentes pares iniciadores de amplificadores *in vitro* dirigidos a diferentes alvos têm sido utilizados. O primeiro a ser testado e mais amplamente usado é o gene B1, que se encontra repetido em 35 cópias no genoma do parasito. Em 1996 Pelloux et al designaram vários iniciadores que se anelam em diferentes localizações do gene. O gene B1 possui um tamanho de 2,2Kb, e demonstrou ter uma natureza repetitiva no genoma, usando o gene B1 demonstrou alta sensibilidade na PCR, com a detecção de apenas um parasito presente no lisado celular como alvo de amplificação. Os resultados descritos sugerem que o DNA do parasito pode ser detectado diretamente do creme leucocitário. Apesar de todos os dados positivos demonstrados pelos autores citados, em 2004 Kompalic-Cristo, encontrou baixa especificidade desse sistema (PCR com gene B1), uma vez que foi evidenciada a co-amplificação de outras seqüências-alvo nos cromossomos humanos. Não obstante, ainda continua sendo o alvo mais usado no diagnóstico de parasitemia (Boothroyd et al. 1988) & (Burg et al. 1989).

Wong & Remington (1993) demonstraram que a sensibilidade e a especificidade da PCR amplificando o gene B1 de parasitos presentes no líquido amniótico foram de 100%, em contraste com a inoculação de sangue fetal ou líquido

amniótico em camundongos e culturas. A possibilidade de realizar PCR para detectar *T. gondii* em sangue humano, como teste diagnóstico, tem sido descrita (Ho-Yen et al. 1992). Assim, a PCR revolucionou o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, uma vez que limita o uso de métodos invasivos no feto (Remington et al. 2004). Outro alvo também amplamente usado é o gene p30, que se encontra representado como cópia única codificando para o principal antígeno de superfície do protozoário. Diferentes pares de iniciadores foram igualmente propostos para esse gene (Weiss et al. 1991). Na literatura, protocolos que empregam PCR convencional (qualitativa) para a detecção de genes em cópia única, como o gene p30, parece menos sensível (Buchinder et al. 2003). Outras seqüências-alvo também têm sido utilizadas como: 1) o gene codificante para o RNA da subunidade menor ribossômica, que se encontra repetido em 110 cópias por genoma; 2) um fragmento de 529 pb presente em 200 a 300 cópias por célula; 3) os genes de cópia única codificantes para α e β tubulina; e 4) um aparente segmento repetitivo de DNA não-codificante (TGR1E) (Bastien 2002). Em 1994 Khalifa et al demonstram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de fluidos corporais diferentes, tais como sangue, líquido amniótico, líquido, humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar e até urina. Por outro lado, a PCR só será positiva em casos de parasitemia; assim, em casos de toxoplasmose cerebral ou pulmonar, a PCR será de utilidade apenas quando houver disseminação ou passagem do parasito para o sangue, tal como ocorre na etapa aguda dessa parasitose.

Nos casos de baixa parasitemia pode ser o método de escolha, permitindo a detecção do parasito e apontando uma interpretação mais exata da etapa de infecção pelo *T. gondii*, indispensável para a prevenção do nascimento de uma criança com toxoplasmose congênita. Nos países nos qual o aborto terapêutico é permitido, abortos desnecessários poderiam ser evitados (James 1996). Em 2002 Bastien relatou que o diagnóstico por PCR para a toxoplasmose está longe de ser padronizado e ainda não se tem um consenso que defina as condições do método. Além de outros fatores, a sensibilidade e a especificidade da PCR dependem não só da seqüência-alvo no DNA do parasito, mas também dos pares de iniciadores de amplificação desenhados. Infelizmente, pouco tem sido publicado para o *Toxoplasma gondii* na literatura nesse sentido. Apesar das raras propostas de PCR

para o diagnóstico de toxoplasmose, elas não são consensuais, e mais comparações são necessárias para se conseguir uma melhor padronização. Apesar de todos esses esforços, pergunta-se ainda se o diagnóstico da toxoplasmose utilizando técnicas moleculares de amplificação de DNA é inequívoco. Em 1990 Grover et al relataram em pacientes IgM-negativos que as PCR apresentavam positividade, desconfiando-se de falsa positividade ou se considerando parasitemia na fase crônica da doença. Vários casos de PCR positivas em pacientes infectados são referidos e se desconhece o valor preditivo positivo do teste (Kompalic-Cristo 2004).

Diagnóstico Imunológico

Reação de Sabin-Feldman: Também conhecida como teste do corante ou dye test, foi o método sorológico clássico de diagnóstico da toxoplasmose. Sendo a primeira prova de alta sensibilidade desenvolvida, mostrou-se capaz de evidenciar e quantificar, por diluição do soro, anticorpos "antiparede". Tem como fundamento o fato de que taquizoítos do exsudato peritoneal de camundongos corados pelo azul-de-metileno, em meio alcalino (pH 11), vistos à microscopia óptica apresentam-se com intensa coloração que assumem forma arredondada ovóide, mas, quando incubados em presença do denominado fator acessório, o fenômeno é impedido pela presença de anticorpos específicos no sangue sob análise. Os parasitos extracelulares perdem sua afinidade tintorial, ficando o núcleo corado, o citoplasma incolor e, morfológicamente, mais delgados, falciformes. O resultado corresponde à diluição do soro que impede a coloração. O fator acessório é soro humano sem anticorpos, possuidor de propriedades capazes de tornarem possível a ocorrência do fenômeno básico da reação (Sabin & Feldman 1948). Esse método é pouco prático no que concerne à realização de inquéritos. Ao ser executado, necessita da elaboração bem recente de preparações indispensáveis, como azul-de-metileno, assim como ter na contagem parasitos corados ou não, etapa realmente difícil e cansativa. Além de todos esses inconvenientes, sofre a influência de critérios de observação variáveis entre diferentes técnicos (Camargo 2001).

Imunofluorescência Indireta (IFI): É considerada de boa especificidade e sensibilidade. Tem sido empregado para amplificar o sinal de fluorescência e aumentar a sensibilidade. Essa reação tem a vantagem de utilizar toxoplasmas preservados, fixados em lâminas de microscopia, tornando-o muito mais prático e seguro para a rotina laboratorial, quando comparada ao Dye test. Além do mais, esse teste permite a identificação dos anticorpos segundo as classes de imunoglobulinas. Pode apresentar resultados falso positivos de anticorpos IgM pela interferência de fatores reumatóides, eventualmente presentes no soro. Os testes para anticorpos IgM podem também revelar resultados falso negativos, devido à competição entre os anticorpos IgG e IgM, impedindo que estes se fixem aos antígenos parasitários (Camargo et al. 1972). Em cerca de 80% dos casos de recém-nascidos com toxoplasmose congênita podem ocorrer resultados falso-negativos, consequência de altos títulos maternos de anticorpos da classe IgG.

Reação de Hemaglutinação Indireta (HAI)

É um excelente método de diagnóstico, devido à sua alta sensibilidade e simplicidade de execução. Entretanto, é inadequado para o diagnóstico precoce (fase aguda) e freqüentemente não detecta toxoplasmose congênita em recém-nascido. É um método adequado para levantamento epidemiológico. A reação se baseia na aglutinação de hemáceas sensibilizadas com antígeno de *T. gondii*. (Kawazoe 2005).

Teste de ELISA

É um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo evidenciado pela ação de uma enzima e o substrato apropriado, sendo revelada por um cromógeno. Esse teste trouxe um grande avanço para o diagnóstico da toxoplasmose e também de outras doenças. Em 1977 Camargo et al descreveram a técnica para anticorpos IgG e IgM, observando porém, presença de resultados falso-positivos para IgM em pacientes portadores do fator reumatóide. Desmonts et al. (1981) desenvolveram uma técnica para detecção de IgM, denominada de ELISA duplo sanduíche (DS – ELISA IgM) ou teste de captura de IgM. Através desta técnica foi possível detectar a presença de IgM específica para *T. gondii* em 92%

dos indivíduos com toxoplasmose recentemente adquirida, e que eram negativos na reação de Imunofluorescência para IgM.

Enzyme Linked fluorescent Assay (ELFA)

É um teste automatizado no sistema VIDAS da Bio-Mérieux usada para detecção de anticorpos da classe IgG e IgM anti *T. gondii*. O princípio da reação associa o método imunoenzimático com uma detecção final em fluorescência. Os anticorpos da classe IgM são pesquisados por imunocaptura. As imunoglobulinas IgM anti toxoplasma são detectadas especificamente graças a um imunocomplexo marcado com fosfatase alcalina. Este método quando comparado com o método o ISAGA apresentou sensibilidade de 93.5%, especificidade de 99.3% e concordância de 98.9% (Manual de Instrução de Uso VIDAS Bio-Mérieux 1998).

Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA)

É usada para a determinação quantitativa de anticorpos da classe IgG e IgM anti toxoplasma no soro ou plasma humano. A reação é realizada no analisador de imunoenensaio, com acesso randômico e contínuo, AXSYM da Abbot. As amostras usadas para pesquisa dos anticorpos da classe IgM são tratadas com tampão de neutralização do Fator Reumatóide (FR), para remover os anticorpos de interferência (se presente) do complexo antígeno-anticorpo, a fim de se evitar resultados falsamente positivos. Ao final da reação, o complexo imune ligado ao conjugado marcado com a fosfatase alcalina reage com o substrato 4-Metil Umbeliferil Fosfato (MUP). A fosfatase alcalina cataliza a hidrólise do MUP a UM (Metil Umbeliferil). A quantidade de fluorescência é proporcional à concentração de anticorpos da amostra analisada (Manual de Instrução de Uso AxSYM –Abbott 2000).

Western blot

É a reação que tem mostrado que o soro materno e o da criança reconhecem diferentes antígenos do *T. gondii*, quando a criança está congenitamente infectada (Chumptazi et al. 1995). Anticorpos das classes IgM e IgA podem ser identificados contra a principal proteína de superfície do *T. gondii*, a proteína p30, pela técnica de

Western blot. Em 1992 Gross et al compararam a técnica de Western blot com a imunocaptura ELISA, e constataram que a primeira técnica tem vantagens sobre a segunda especialmente no diagnóstico da toxoplasmose cerebral dos pacientes com AIDS. No paciente com HIV e encefalite, o uso dessa reação mostra diversidade antigênica entre diferentes cepas do *T. gondii*.

1.8- Ensaio Bioquímicos

Os testes bioquímicos realizados no A25 (Figura 5) têm como princípio os fundamentos dos métodos. Para cada reação enzimática e/ou outras substâncias biológicas, são realizadas leituras de acordo com um determinado comprimento de onda previamente estabelecido pelo fabricante do kit (*BioSystems*[®]) e também respeitando a pela velocidade das reações. O Aspartato aminotransferases cataliza a transferência do grupo amino do aspartato a 2-oxoglutarato, formando oxalacetato e glutamato. A concentração catalítica determina-se, seguindo a reação da desidrogenase láctica (MHD), a partir daí a velocidade de desaparecimento do NADH, então o produto final da reação é medido a 340 nm (Bartels & Bohmer 1971). A alanina aminotransferase catalisa a transferência do grupo amino da alanina aos α -cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. A concentração catalítica determina-se, seguindo a reação da desidrogenase láctica, então a partir da velocidade de desaparecimento do NADH é feita a leitura em 340nm dessa reação. A fosfatase alcalina catalisa em meio alcalino a transferência do grupo fosfato de 4-nitrofenilfosfato aos 2-amino-2-metil-1-propanol, liberando 4-nitrofenol. A concentração catalítica determina-se a partir da velocidade de formação de 4-nitrofenol, medido a 405 nm. A gamma-glutamyltransferases catalisa a transferência do grupo gama-glutamil da gama-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida á glicilglicina, liberando 3-carboxi-4-nitroanilina. A concentração catalítica determina-se a partir da velocidade de formação da 3-carboxi-4-nitroanilina em comprimento de onda de 405 ou 410 nm. A desidrogenase láctica catalisa redução do piruvato por NADH, obtendo-se lactato e NAD⁺. A concentração catalítica determina-se a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, medido pelo comprimento de onda de 340 nm (Friendman & Young 1997). A uréia presente na amostra é capaz de consumir NADH que é quantificado espectrofotometricamente, em 340 nm (Yong, 1997). A

creatinina presente na amostra reage com o picrato em meio alcalina originando um complexo colorido. Nessa reação mede-se a velocidade da formação do dito complexo em períodos curtos iniciais, evitando-se assim interferências de outros compostos (Fabriny & Ertingshausen 1971).



Figura 5: Equipamento A25 da (*Biosystems*) para realização de metodologia automatizada.

2. JUSTIFICATIVA

A eficácia do controle e tratamento de uma doença parasitária depende do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia do parasito e da interação com seu hospedeiro. Os avanços dos conhecimentos anatômicos, bioquímicos, estudos fisiológicos, e o entendimento dos ciclos de vida dos parasitos no homem, permitem que atualmente se realize um processo de planejamento de tratamento de maneira mais racional, com ênfase no mecanismo de ação, visando atingir diretamente os alvos específicos e essenciais dos parasitos.

Um dos problemas no diagnóstico dos indivíduos cronicamente infectados pelo *T. gondii*, é a detecção do parasito ou saber se a infecção está ativa. O conhecimento das alterações bioquímicas provocadas pelo *T. gondii* em seu hospedeiro poderá ser mais um dado valioso na complexa avaliação clinica. Dessa forma, justifica-se o estudo experimental das alterações enzimáticas AST, ALT, GGT, FAL e DHL para a avaliação hepática e a função renal, dosando-se a uréia e creatinina, utilizando para isto camundongos BALB/c com cepas de comportamento extremos, uma cepa cistogênica (ME-49) e outra não cistogênica (RH).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Analisar a alteração da função hepática e renal causada pelo *T. gondii* em camundongos BALB/c infectados com cepa não cistogênica (RH) e cistogênica (ME-49) por meio das alterações enzimáticas no soro e no exsudato peritoneal das enzimas AST, ALT, GGT, FAL, DHL, e dos produtos uréia e creatinina.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar bioquimicamente a função hepática de camundongos BALB/c infectados com cepa não cistogênica (RH) e cistogênica (ME-49) através de análises das enzimas AST, ALT, GGT, FAL e LDH no soro e exsudato peritoneal por método automatizado (A25);
- Avaliar bioquimicamente a função renal de camundongos BALB/ infectados e não infectados com cepa não cistogênica (RH) e cistogênica (ME-49) de *T. gondii*, através das dosagens dos níveis de Uréia e Creatinina, por método automatizado (A25).

4. METODOLOGIA

Esse trabalho foi realizado no laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano e no laboratório de Bioquímica no setor de Parasitologia do Departamento Parasitologia e Patologia - DMIPP do Instituto de Patologia Tropical e saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP), em parceria com Laboratório de análises clínicas do Hospital do Policial Militar do Estado de Goiás.

4.1 Delineamento experimental

Para análise dos objetivos propostos, foram utilizados camundongos BALB/c com 30 dias de vida de ambos os sexos, devido à alta susceptibilidade desses animais em inoculação experimental. Foram divididos em três grupos: 1º camundongos infectados com a cepa RH, 2º camundongos infectados com a cepa ME-49 e 3º camundongos não infectados.

Para a cepa RH, foi utilizado um grupo de cinco camundongos, totalizando 30 animais para todo experimento, inoculados com 0,2 ml de lavado peritoneal de camundongos previamente infectados. Esses camundongos foram acompanhados diariamente, e após 24 horas eram submetidos ao sacrifício, posteriormente as amostras de sangue e exsudato peritoneal foram coletados até o quinto dia de infecção e encaminhados para as análises bioquímicas.

Para a cepa ME- 49 foram utilizados um grupo de 30 camundongos inoculados com macerado cerebral de camundongos previamente infectados contendo aproximadamente 10 cistos. Os camundongos foram acompanhados diariamente em grupos de cinco camundongos e foram sacrificados com 30, 60, 90 e 120 dias após a infecção. Posteriormente eram coletados o sangue e exsudato peritoneal e encaminhados para as análises bioquímicas.

No grupo controle foi utilizado camundongos sem infecção, com as mesmas características utilizadas nos grupos infectados. A inoculação de salina estéril foi realizada com o mesmo volume utilizado no grupo dos camundongos infectados, submetendo-os, portanto, ao mesmo grau de “*estresse*” dos que foram infectados.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A cepa RH foi cedida gentilmente pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e foi mantida em camundongos BALB/c com 30 dias de vida de ambos os sexos no biotério do IPTSP, por repiques semanais. Esses animais foram monitorados diariamente, permanecendo no biotério do IPTSP que fornece condições favoráveis para a sobrevivência e bem estar dos animais como temperatura adequada de 22 a 25 °C, luminosidade controlada, dieta com ração da marca Nuvilav® autoclavada, água autoclavada e acidificada, com ácido acético a 5%, servido a vontade sem restrições. Os camundongos foram mantidos em gaiolas sendo feito a limpeza e troca de gaiolas duas vezes por semana.

Cepa RH

Foram infectados 5 animais por experimento via intraperitoneal, utilizando 1.000 parasitos/camundongo da cepa RH, proveniente de camundongos previamente infectados, diluído em 0,2 mL de salina estéril. Esses camundongos foram sacrificados de 24 em 24 horas até o quinto dia. Após o sacrifício era retirado o sangue do camundongo por punção cardíaca usando heparina para impedir a coagulação sanguínea, só então era extraído o lavado peritoneal pela injeção de 5 ml de salina intraperitoneal e posteriormente o líquido contendo taquizoitos era aspirado. O sangue foi submetido à centrifugação de 3000rpm por 15 minutos, após a separação das hemácias separava-se o soro em tubos tipo *ependorfs* e então esse material era encaminhado para as análises bioquímicas das enzimas AST, ALT, GGT, FAL, DHL e da uréia e creatinina pela metodologia automatizada A25 (*Random Access Analyzer Clinical Chemistry-Turbidimetria*).

O lavado peritoneal foi submetido à microscopia óptica para a confirmação da infecção pela presença do parasito (taquizoíto) nesse líquido e aliqotado e encaminhado para as análises bioquímicas.

Todo esse procedimento foi realizado utilizando camundongos infectados com a cepa RH e camundongos não infectados como controle do experimento. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Cepa - ME-49

Para a cepa ME-49 foram utilizados 20 camundongos infectados com macerado cerebral. Para o experimento proposto, cérebros de camundongos anteriormente infectados, foram submetidos à maceração juntamente com 4 mL de salina, e uma suspensão do macerado contendo 10 cistos em 0,2 mL foi inoculada em camundongos BALB/C que foram sacrificados aos 30, 60, 90 e 120 dias após a infecção. Após o sacrifício foi extraído o soro e exsudato peritoneal dos camundongos infectados e controles como já descrito anteriormente nos procedimentos da cepa RH. Do soro extraído além de ser submetido às análises bioquímicas das enzimas AST, ALT, GGT, FAL, DHL e da uréia e creatinina, a IFI foi realizada para a devida confirmação da infecção pelo parasito, sendo que todas as amostras submetida à IFI foram positivas, apresentando IgG positiva e IgM negativa. Todos esses procedimentos foram realizados em triplicata.

A seguir apresentamos o fluxograma dos procedimentos realizados:

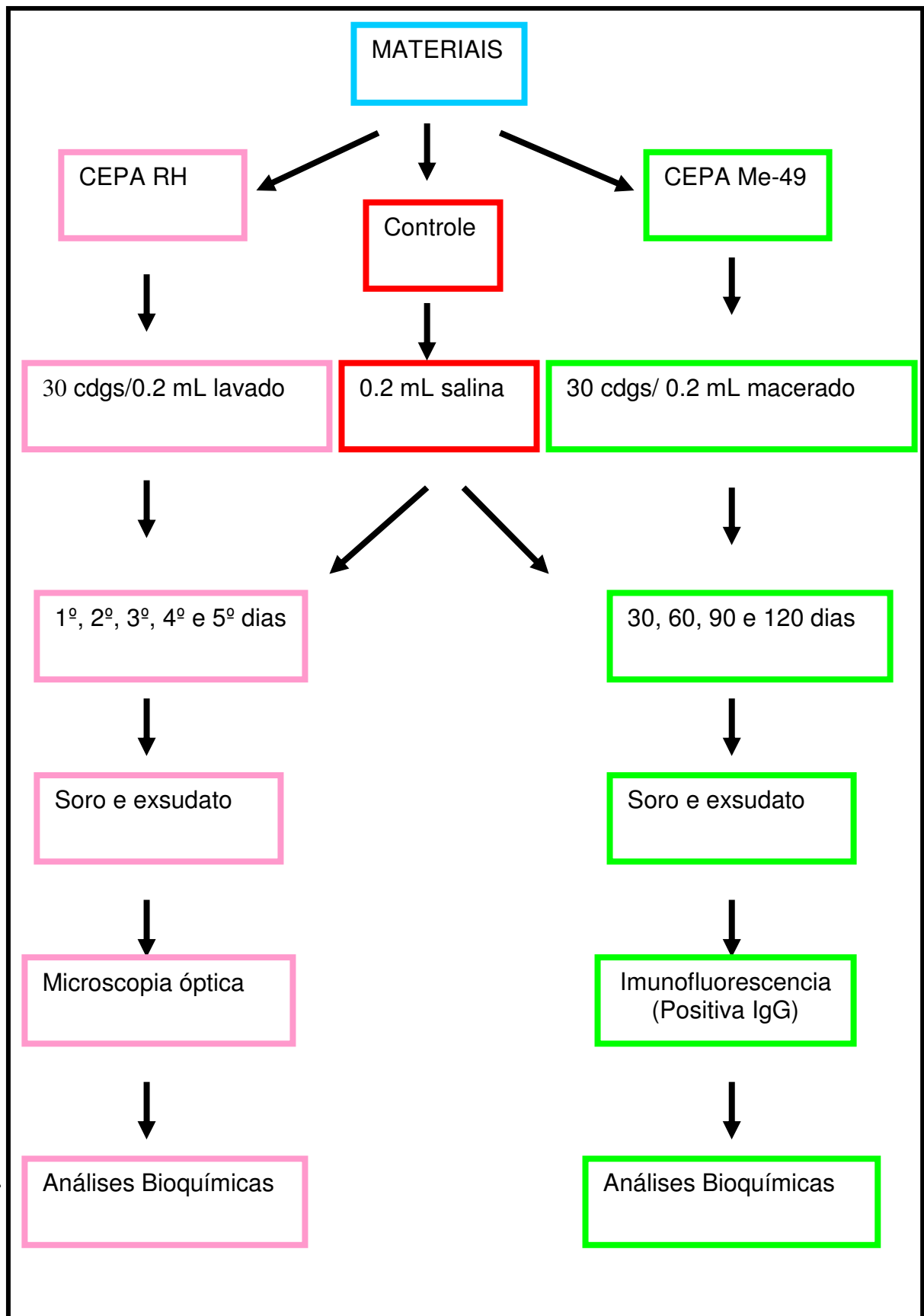


Figura 6: Fluxograma da metodologia

4.1. Análise Bioquímica - Testes Automatizados

Automatização A25-BioSystems®

Em todas as amostras coletadas (soro e exsudato peritoneal) foram realizados testes bioquímicos para a avaliação hepática e renal dos camundongos infectados e controles. As amostras estudadas foram processadas no sistema automatizado A25 Biosystems® que é um aparelho programado para laboratórios clínicos de capacidade média, assegurando máxima funcionalidade e bons serviços ao usuário. É um equipamento que usa tanto os métodos cinéticos, no caso das dosagens das AST, ALT, FAL, GGT e DHL quanto método enzimático nas dosagens da uréia e creatinina. Utiliza-se de um analisador, espectrofotômetro ou fotômetro com cuvetas termostaticada a 37°C nos comprimentos de onda de 340, 405 e 500 nm com programação estabelecida de acordo com o fabricante. Foram utilizados kits comerciais da BioSystems® próprios para este equipamento.

4.2. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada por meio do programa *Sigma Stat*. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea foram utilizados testes paramétricos (paramétrico e Tukey). Nos casos em que a distribuição não foi normal ou que a variância não foi homogênea foram utilizados testes não paramétrico (ANOVA). As proporções e as correlações também foram avaliadas. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5- RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1- Avaliação bioquímica da função hepática no soro de camundongos BALB/c infectados com cepa não cistogênica (RH) de *T. gondii*.

As concentrações das enzimas dosadas para análises de alterações hepáticas em camundongos infectados com a cepa RH estão representadas na tabela 2. Pode-se observar que as aminotransferases (AST e ALT) mostraram alterações significativas do primeiro ao quinto dia em relação aos controles.

As alterações nas concentrações da AST foram significativas ($p=0,001$) e detectadas em todos os dias pós infecção, chamando a atenção para o 4º e 5º dia, com aumento considerável em relação aos controles, sendo que essas alterações indicam lesão mitocondrial das células hepáticas. Provavelmente os parasitos estão se multiplicando nos hepatócitos o que justificaria altos níveis de lesão e consequentemente dessas enzimas no soro.

As concentrações obtidas da enzima ALT do 1º ao 5º dia também foram significativas ($p=0,001$) em relação aos valores encontrados no controle. Indicando que a cepa RH do *T. gondii* que é uma cepa de alta virulência causa lesões grave nas células hepáticas a partir do 1º dia pós- infecção. Não se encontrou na literatura relatos de lesões hepáticas causadas pela infecção por *T. gondii*.

Hagiwara em 2004 evidenciou que o comprometimento hepático pelo aumento nos níveis séricos de parâmetros bioquímicos é achado freqüente nos casos de leptospirose canina aguda. As colestases são mais freqüentemente relatadas na leptospirose aguda (Navarro 1981). Em 2005, Chang descreveu o aumento das AST em pacientes humanos com leptospirose aguda. O aumento de atividade dessas enzimas é usualmente associado à lesão hepática, notadamente quando ocorre necrose de hepatócitos (Lassen 2004). Estes dados indicam que vários agentes infecciosos podem causar lesão hepática com alterações drásticas dos níveis séricos de AST.

Em 2008 Couto et al avaliaram alterações da função hepática em camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni* e os resultados obtidos indicam grave lesão hepática, de forma semelhante ao observado nos camundongos de nosso estudo, infectados com um protozoário, em que as enzimas

AST e ALT apresentaram alterações indicativas de lesões hepáticas pela presença do parasito.

A enzima gama GT do primeiro ao quinto dia não mostrou nenhuma diferença estatística quando comparada aos controles. As análises das concentrações da FAL no soro dos camundongos infectados pela cepa RH também não demonstrou alterações significativas. Estas enzimas demonstram lesões hepáticas que acometem os ductos biliares, ou seja, que causam Colestases, manifestando-se de forma crônica.

A alteração hepática demonstrada nas dosagens de AST e ALT, provavelmente está relacionada à destruição celular no órgão afetado. Como a cepa RH mata os camundongos rapidamente (5 a 7 dias de infecção), assim não haveria tempo suficiente para alteração da GGT e FAL

As análises da concentração da DHL no soro dos camundongos infectados em relação ao controle demonstraram aumento gradual e significativo durante todos os cinco dias de análise ($p < 0,001$). Como essa enzima pode ser proveniente de vários tecidos, associada aos níveis de AST e ALT alterados, que é o caso do nosso estudo, podem ser correlacionadas com a disfunção hepática, porém não devem ser descartadas as condições clínicas em que camundongo encontrava-se, uma fase aguda caracterizada pela severa virulência da cepa utilizada (RH). Supõe-se que além de todas as alterações hepáticas já demonstradas esses camundongos, provavelmente estão sofrendo lesões em outros órgãos, levando a um quadro de falência múltipla dos órgãos, tendo em vista as concentrações elevadíssimas das enzimas (ALT, AST e LDH) nos últimos dias (4^o e 5^o) de infecção.

Tabela 2: Concentrações das enzimas AST, ALT, GGT, FAL e LDH no soro de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* (RH) e controle não infectados.

Exames	1º dia		2º dia		3º dia		4º dia		5º dia	
	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C
AST UI/L	170,0*	116,7	473,0*	323,3	377,0*	363,3	835,0*	346,7	6210,0*	291,0
	(±4,2)	(± 3,9)	(± 10,0)	(± 12,4)	(± 7,16)	(± 9,2)	(± 5,9)	(± 8,6)	(± 12,8)	(± 3,2)
ALT UI/L	136,7*	93,3	450,0*	196,7	312,0*	190,0	417,0*	196,7	753,0*	184,0
	(± 5,7)	(± 5,7)	(± 5,5)	(± 12,7)	(± 3,2)	(± 6,0)	(± 5,0)	(± 9,6)	(± 10,5)	(± 11,2)
GGT U/L	11,7	20,0	10,0	20,0	10,0	36,7	10,0	20,0	15,0	16,7
	(± 1,7)	(± 3,2)	(± 5,0)	(± 4,2)	(± 0,0)	(± 5,5)	(± 0,0)	(± 3,2)	(± 2,2)	(± 2,4)
FAL UI/L	133,3	190,0	153,3	220,0	243,3	256,0	236,7	340,0	283,3	220,0
	(± 9,5)	(± 6,0)	(± 10,7)	(± 6,6)	(± 7,6)	(± 9,1)	(± 12,0)	(± 13,3)	(± 11,1)	(± 8,7)
LDH U/L	1293,3*	184,3	3103,3*	276,0	4496,0*	363,0	5960,0*	390,0	10416,0*	456,0
	(±10,0)	(± 11,1)	(± 28,2)	(± 15,0)	(± 31,1)	(± 14,1)	(± 33,5)	(± 13,5)	(± 13,9)	(± 12,8)

*p≤ 0,005; ± Desvio-padrão; AST: Aspartato Aminotransferases, ALT: Alanina Aminotransferases, GGT: Gama Glutamiltransferases, FAL: Fosfatase Alcalina, LDH: Lactato Desidrogenase

5.2- Avaliação bioquímica da função hepática no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c infectados com cepa não cistogênica (RH) de *T. gondii*.

Como demonstrado na tabela 3, não se encontrou diferença estatística nos níveis das enzimas AST, ALT, Gama - GT e Fosfatase alcalina no exsudato peritoneal de camundongos infectados com a cepa RH em relação aos valores obtidos do grupo controle. Provavelmente pelo fato de que essas enzimas não estão presentes em grande quantidade nesse líquido e sim em maior quantidade no soro.

Entretanto, foi possível observar alteração significativa em relação à enzima DHL no quinto dia pós-infecção ($p=0,016$). Como essa enzima está presente em quase todas as células, provavelmente devido à grande destruição celular que ocorreu no organismo desse hospedeiro, para a multiplicação do parasito.

Tabela 3: Concentrações das enzimas AST, ALT, GGT, FAL e LDH no Exsudado peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* (RH) e controle não infectados.

Exames	1º dia		2º dia		3º dia		4º dia		5º dia	
	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C
AST UI/L	7,0 (± 1,9)	6,33 (± 2,7)	17,3 (± 4,6)	8,3 (± 3,0)	30,0 (± 6,4)	5,3 (± 2,0)	80,0 (± 10,9)	5,7 (± 2,3)	121,7 (± 14,0)	8,0 (± 2,6)
ALT UI/L	17,0 (± 2,4)	20,3 (± 3,8)	9,5 (± 3,0)	11,7 (± 2,4)	60,4 (± 7,8)	11,3 (± 1,2)	96,0 (± 5,6)	16,0 (± 3,0)	85,0 (± 4,1)	9,3 (± 2,8)
GGT U/L	1,3 (± 0,8)	2,0 (± 1,31)	0,7 (± 0,8)	2,3 (± 1,6)	1,3 (± 0,8)	2,3 (± 1,5)	2,0 (± 1,0)	3,0 (± 1,3)	2,0 (± 1,0)	2,3 (± 1,5)
FAL UI/L	8,3 (± 1,8)	7,3 (± 2,0)	6,3 (± 1,7)	9,7 (± 2,3)	10,7 (± 3,0)	8,3 (± 2,4)	10,3 (± 3,0)	8,3 (± 2,3)	13,7 (± 3,2)	7,3 (± 2,4)
LDH U/L	136,7 (± 6,1)	166,3 (± 4,5)	203,3 (± 8,4)	136,0 (± 5,6)	160,7 (± 5,3)	155,0 (± 7,5)	197,7 (± 1,2)	170,0 (± 8,1)	319,9* (± 9,2)	137,0 (± 7,4)

*p≤ 0,005; ± Desvio-padrão; AST: Aspartato Aminotransferases, ALT: Alanina Aminotransferases, GGT: Gama Glutamiltransferase, FAL: Fosfatase Alcalina, LDH: Lactato Desidrogenase.

5.3- Avaliação bioquímica da função renal no soro de camundongos BALB/c infectados com cepa não cistogênica (RH) de *T. gondii*

As avaliações da função renal pelas dosagens de uréia ($p= 0, 502$) e creatinina ($p= 0,940$) nos grupos estudados e grupos controles em soro de camundongos infectados com cepa não cistogênica (RH) não mostraram alterações significativas (Figura 7 e 8). Esses resultados indicam que não houve lesão renal nos camundongos infectados e que provavelmente o parasito não se multiplica nas células renais, ou que complexos imunológicos não são formados nestes períodos, não lesionando os néfrons. Não se encontrou na literatura dados indicando avaliação da função renal em infecções causadas pelo *T. gondii*. Entretanto, em Rigo et al em 2009 avaliaram a lesão renal provocada pela *Leishmania* em humanos através da uréia e creatinina e puderam supor que o próprio protozoário pode provocar lesão renal devido às alterações nas dosagens de uréia e creatinina séricas.

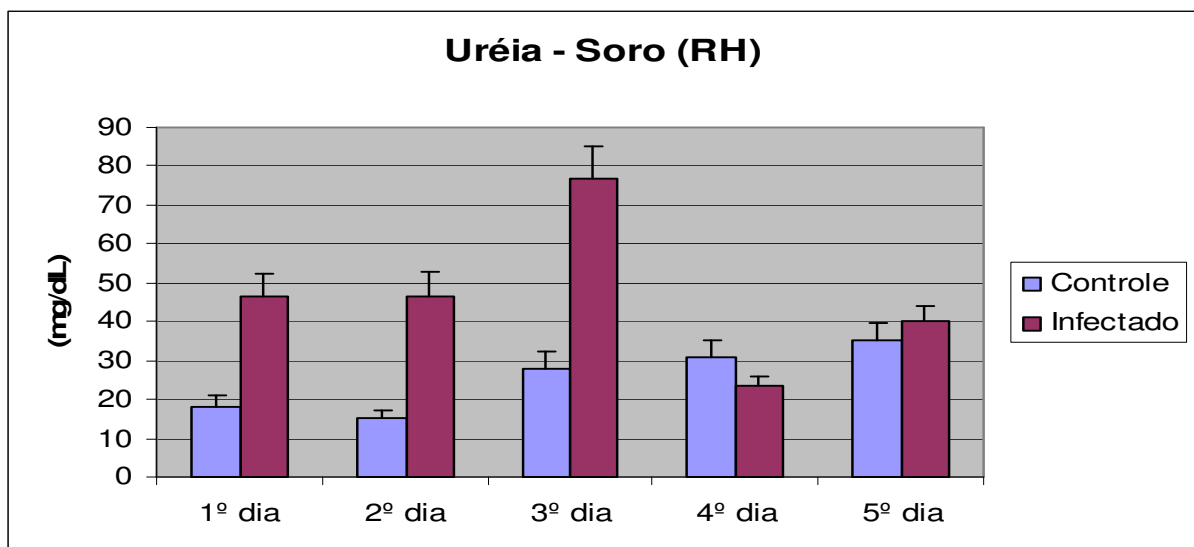


Figura 7: Concentrações de Uréia no soro de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* cepa RH e controles não

infectados.

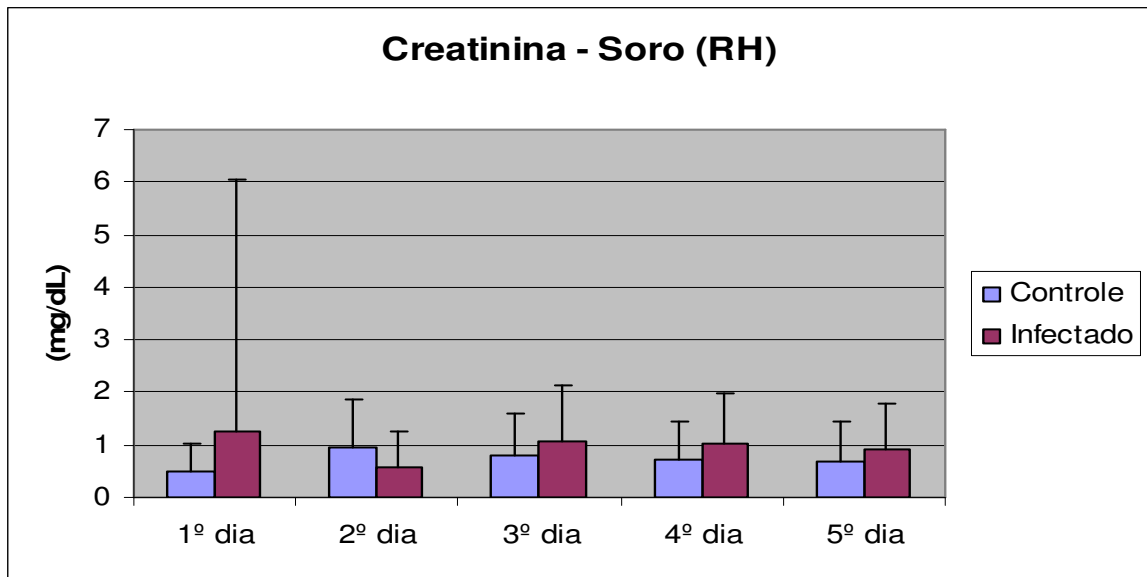


Figura 8: Concentrações de Creatinina no soro de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* cepa RH e controles não infectados.

5.4- Avaliação bioquímica da função renal no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c infectados com cepa não cistogênica (RH) de *Toxoplasma gondii*.

A análise das dosagens de uréia, em exsudato peritoneal de camundongos infectado com cepa RH, não demonstrou diferença significativa em relação ao controle não infectado (Figura 9).

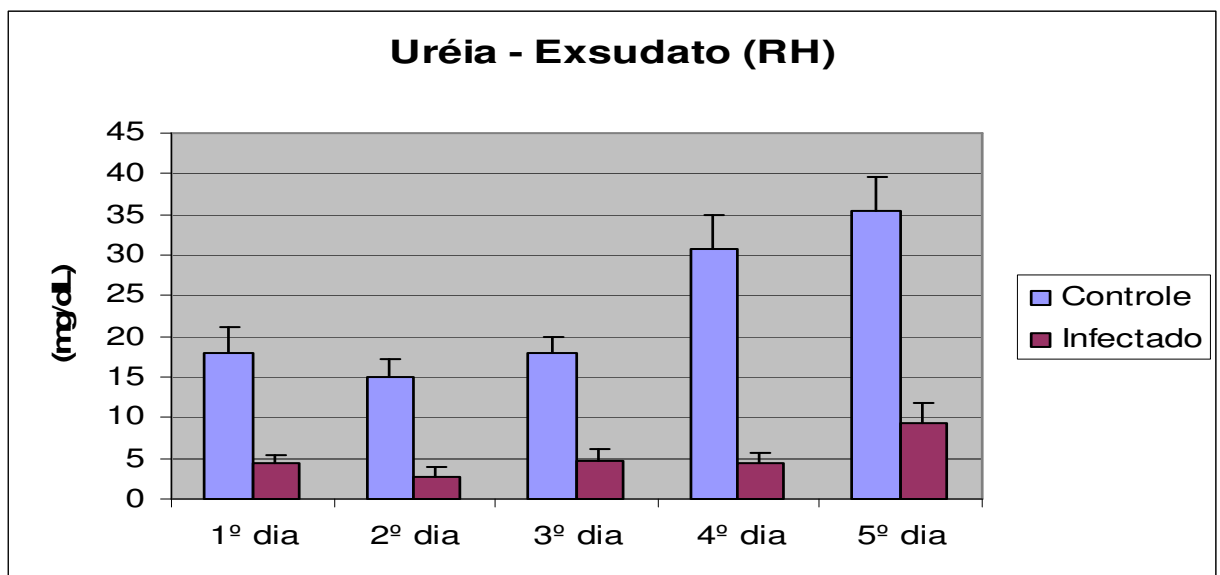


Figura 9: Concentrações da análise bioquímicas de Uréia no exsudato peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* cepa RH e controles não infectados.

Os dados referentes à creatinina ($p=0,612$), também não demonstraram diferença em relação aos controles não infectados (Figura 10).

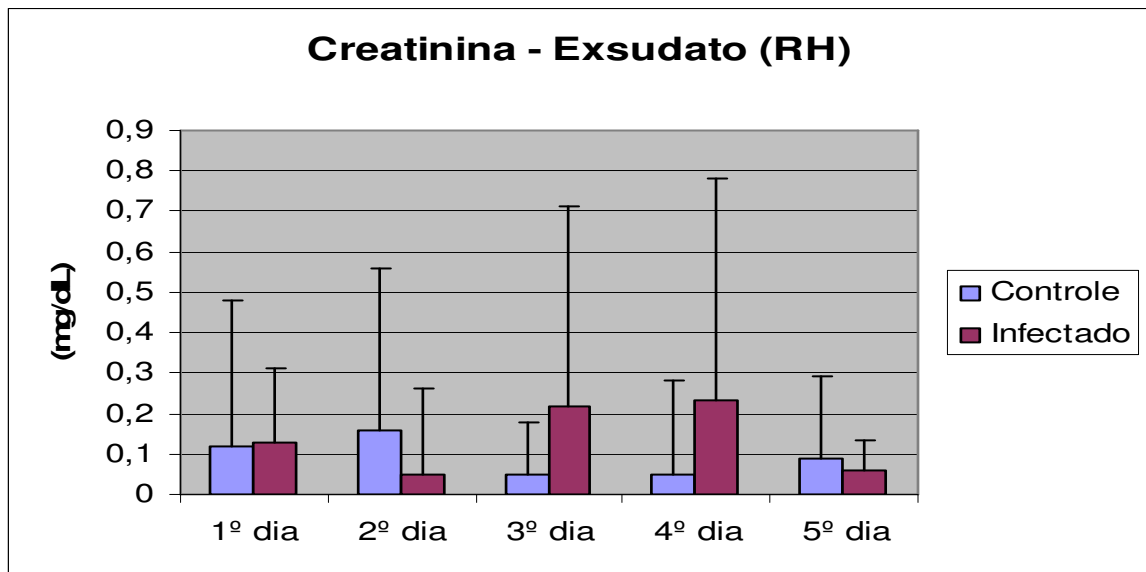


Figura 10: Concentrações da análise bioquímicas de Creatinina no exsudato peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* cepa RH e controles não infectados.

5.5 Avaliação bioquímica da função hepática no soro de camundongos BALB/c infectados com cepa cistogênica (ME-49) de *Toxoplasma gondii*.

As análises das enzimas AST, ALT, GGT, FAL e LDH, que avaliaram a função hepática dos camundongos infectados com cepa ME-49 demonstraram alterações em todas as amostras coletadas, quando comparadas ao controle. Quanto maior o tempo de infecção, maiores as alterações observadas.

A cepa ME-49 é cistogênica e com baixa virulência, visto que nenhum dos animais morreram durante o período de observação (120 dias), quando inoculados apresentaram sintomatologia discreta, que após a primeira semana desaparece, continuando assintomáticos por todo o período analisado.

Apesar de não apresentarem alterações clínicas, foram observadas alterações em todas as enzimas hepáticas dosadas; Inferimos que estas alterações possam estar relacionadas ao processo inflamatório, pois na fase crônica da toxoplasmose há formação de cistos por todo o organismo do camundongo, que se rompem e dão origem a um processo inflamatório local, conforme demonstrado por (Coutinho & Vergar 2005). Processo semelhante foi descrito por Couto e et al (2008) em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, com alteração da AST e ALT.

Em 2002, Aquino relatou que a infecção por *Trypanosoma evansi* também pode provocar alterações nos exames bioquímicos realizados no soro de animais infectados. Na maioria das espécies, a atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT), da aspartato aminotransferase (AST) e da creatinina aumentam significativamente. O aumento da atividade enzimática da ALT sugere lesão hepática. Os resultados obtidos estão em concordância com outros estudos, onde a dosagens séricas altas para as enzimas hepáticas e para a creatinina foram encontradas em cães infectados com o protozoário, também em coatis (Herrera 2002) e ratos (Monzon & Villavicencio 1990).

Hagiwara em (2004) evidenciou que o comprometimento hepático pelo aumento nos níveis séricos de parâmetros bioquímicos, sendo achados frequentes nos casos de leptospirose canina aguda. As Colestases são mais freqüentemente relatadas na leptospirose aguda (Navarro 1981). Em 2005, Chang descreveu o aumento das AST em pacientes humanos com leptospirose aguda.

O aumento de atividade dessas enzimas é usualmente associado à lesão hepática, notadamente quando ocorre necrose de hepatócitos (Lassen 2004).

Tabela 4: Concentrações (média \pm desvio padrão) dos níveis séricos de AST, ALT, GGT, FAL e LDH de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* (ME- 49) e controle não infectados.

Exames	30 DIAS		60 DIAS		90 DIAS		120 DIAS	
	I	C	I	C	I	C	I	C
AST UI/L	390,7*	117,0	505,0*	105,0	975,0*	94,7	300,0*	106,2
	($\pm 3,9$)	($\pm 4,9$)	($\pm 13,4$)	($\pm 13,6$)	($\pm 18,7$)	($\pm 4,7$)	($\pm 3,7$)	($\pm 13,3$)
ALT UI/L	43,0*	82,2	382,5*	86,5	750,0*	82,5	292,5*	82,7
	($\pm 3,8$)	($\pm 2,6$)	($\pm 9,6$)	($\pm 2,1$)	($\pm 15,8$)	($\pm 2,5$)	($\pm 4,1$)	($\pm 2,7$)
GGT U/L	21,5	28,2	25,0	24,7	25,0	28,0	32,5	26,7
	($\pm 1,0$)	($\pm 2,40$)	($\pm 3,20$)	($\pm 2,0$)	($2\pm,40$)	($\pm 2,02$)	($\pm 3,55$)	($\pm 2,14$)
FAL UI/L	127,75	145,7	174,2	126	282,5	126	342,5	142,7
	($\pm 2,1$)	($\pm 6,0$)	($\pm 13,9$)	($\pm 2,1$)	($\pm 6,8$)	($\pm 1,7$)	($\pm 9,8$)	($\pm 5,0$)
LDH U/L	730,2*	157,5	4927,0*	84,2	4390,0*	139,2	3772,5*	98,0
	($\pm 12,3$)	($\pm 9,5$)	($\pm 26,5$)	($\pm 7,5$)	($\pm 23,3$)	($\pm 8,7$)	($\pm 34,9$)	($\pm 6,0$)

* $p \leq 0,005$; \pm Desvio-padrão; AST: Aspartato Aminotransferases, ALT: Alanina Aminotransferases, GGT: Gama Glutamyltransferase, FAL: Fosfatase Alcalina, LDH: Lactato Desidrogenase.

5.6 Avaliação bioquímica da função hepática no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c infectados com cepa cistogênica (ME-49) de *Toxoplasma gondii*.

As enzimas AST, GGT e FAL, quando observadas nas dosagens no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c infectados com a cepa cistogênica (ME-49), quando comparadas com os controles mantiveram-se estáveis em relação às concentrações encontradas nos controles (Tabela 5). Contudo, a não alteração dessas enzimas em relação ao controle no exsudato peritoneal vem confirmar a presença das concentrações séricas correlacionando-se com o grau de lesão, já que estas enzimas são intracelulares, e são encontradas no soro a partir de células destruídas, e não no exsudato peritoneal. (Braunwald et al. 2001).

Tabela 5: Concentrações (média \pm desvio padrão) dos níveis de AST, ALT, GGT, FAL e LDH do exsudato de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* ((ME- 49) e controle não infectados.

Exames	30 DIAS		60 DIAS		90 DIAS		120 DIAS	
	I	C	I	C	I	C	I	C
AST UI/L	16,7 ($\pm 0,9$)	16,0 ($\pm 1,7$)	17,2 ($\pm 1,7$)	16,5 ($\pm 3,6$)	30,5 ($\pm 3,3$)	14,7 ($\pm 4,5$)	21,7 ($\pm 1,3$)	16,5 ($\pm 1,7$)
ALT UI/L	12,7 ($\pm 0,9$)	13,75 ($\pm 1,9$)	21 ($\pm 3,9$)	12,5 ($\pm 1,2$)	22 ($\pm 3,5$)	12 ($\pm 1,3$)	12,25 ($\pm 2,0$)	15,2 ($\pm 2,9$)
GGT U/L	3,0 ($\pm 1,7$)	4,75 ($\pm 0,9$)	1,0 (± 0)	4,5 ($\pm 1,1$)	1,5 ($\pm 0,7$)	5,5 ($\pm 1,1$)	1,5 ($\pm 0,7$)	5,7 ($\pm 1,3$)
FAL UI/L	16,7 ($\pm 1,6$)	16,0 ($\pm 1,6$)	15,2 ($\pm 0,98$)	15,2 ($\pm 1,49$)	14,2 ($\pm 1,31$)	15,2 ($\pm 1,3$)	17,5 ($\pm 1,6$)	16 ($\pm 1,4$)
LDH U/L	122,2 ($\pm 2,6$)	137,7 ($\pm 5,5$)	145 ($\pm 5,8$)	147,7 ($\pm 4,9$)	117,0 ($\pm 1,4$)	130,2 ($\pm 5,7$)	117,7 ($\pm 0,9$)	135,5 ($\pm 6,0$)

$p \leq 0,005$; \pm Desvio-padrão; AST: Aspartato Aminotransferases, ALT: Alanina Aminotransferases, ,
GGT: Gama Glutamilttransferase, FAL: Fosfatase Alcalina, LDH: Lactato Desidrogenase

5.7 Avaliação da função renal no soro de camundongos BALB/c infectados com cepa cistogênica (ME-49) de *Toxoplasma gondii*.

A análise das dosagens de uréia demonstrou alterações significativas nos quatro meses do experimento, ($p \leq 0,001$), nas análises entre os infectados e seus controles, e entre as amostras dos infectados (Figura 11). Dessa forma, ficou demonstrando que com a instalação de cistos de *T. gondii* essa alteração torna-se evidente, por meio da dosagem de uréia podendo correlacionar com a presença do parasito, comparando a alteração com o aumento dos dias de inoculação. Sugerindo que com a presença do cisto instalado no órgão desencadeia um processo inflamatório podendo acarretar alterações e um comprometimento renal no hospedeiro.

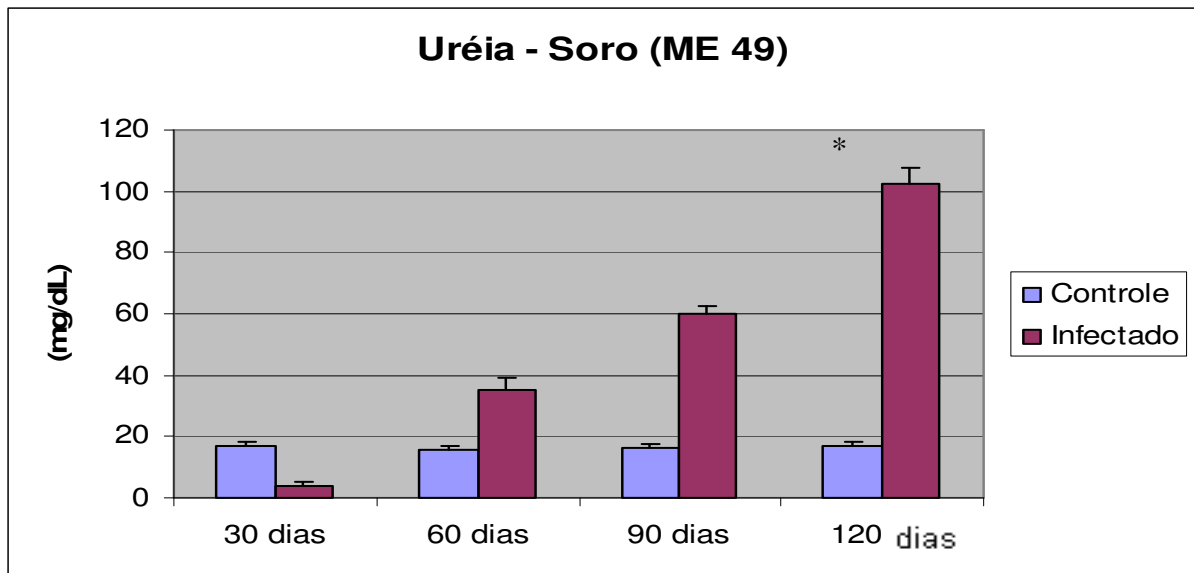


Figura 11: Concentrações da análise bioquímicas de Uréia no soro peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 e controles não infectados.

Por outro lado, as dosagens de creatinina no soro dos camundongos infectados com a cepa cistogênica (ME-49), através desta análise não foi possível observar alterações nas concentrações da creatinina (Figura 12). A ausência de publicações na literatura científica que validem esses resultados indica a necessidade de mais estudos exploratórios em relação à presença desse parasito no hospedeiro.

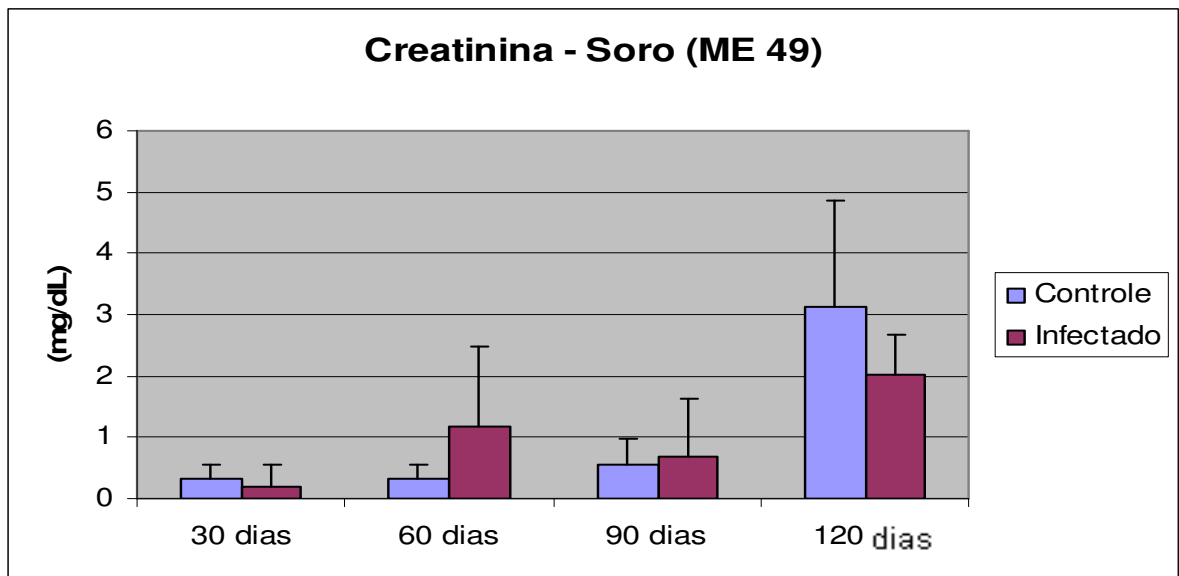


Figura 12: Concentrações da análise bioquímicas de Creatinina no soro de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 e controles não infectados.

5.8 Avaliação bioquímica da função renal no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c infectados com cepa cistogênica (ME-49) de *Toxoplasma gondii*.

Como demonstrado na figura 13 e 14 a uréia e creatinina dosada no exsudato peritoneal de camundongos infectados com cepa cistogênica não demonstraram alterações significativas ($p > 0.05$). A partir do sexagésimo dia a uréia manteve-se estável em relação aos controles permanecendo até o dia 120 dias. A creatinina mostrou uma alteração em 30 dias de inoculados, mas, manteve-se estável nos demais dias em relação aos controles não infectados. Contudo, esses dados vêm confirmar a baixa existência dessa substância no exsudato peritoneal confirmando mais uma vez que as lesões renais devem ser avaliadas no soro e não no exsudato, pois, não serve como parâmetro para identificar lesão renal através desse líquido devido às baixas concentrações dessas substâncias existentes no exsudato peritoneal. Devido à ausência de publicações que colaboram com nossos estudos

incentivou-nos a continuar as buscas pelo conhecimento nessa área.

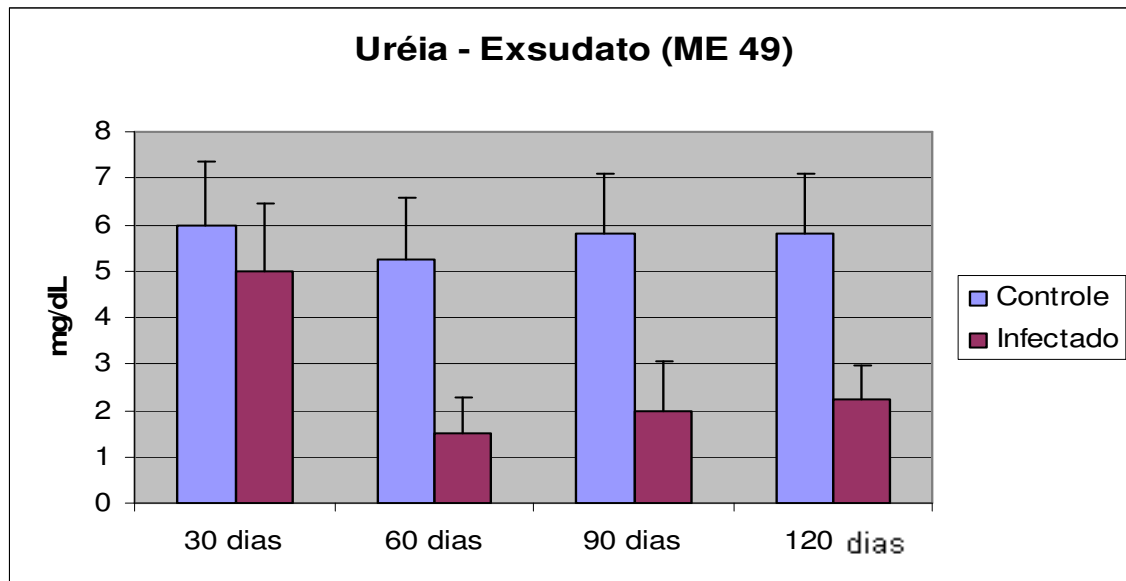


Figura 13: Concentrações da análise bioquímicas de Uréia no exsudato peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 e controles não infectados.

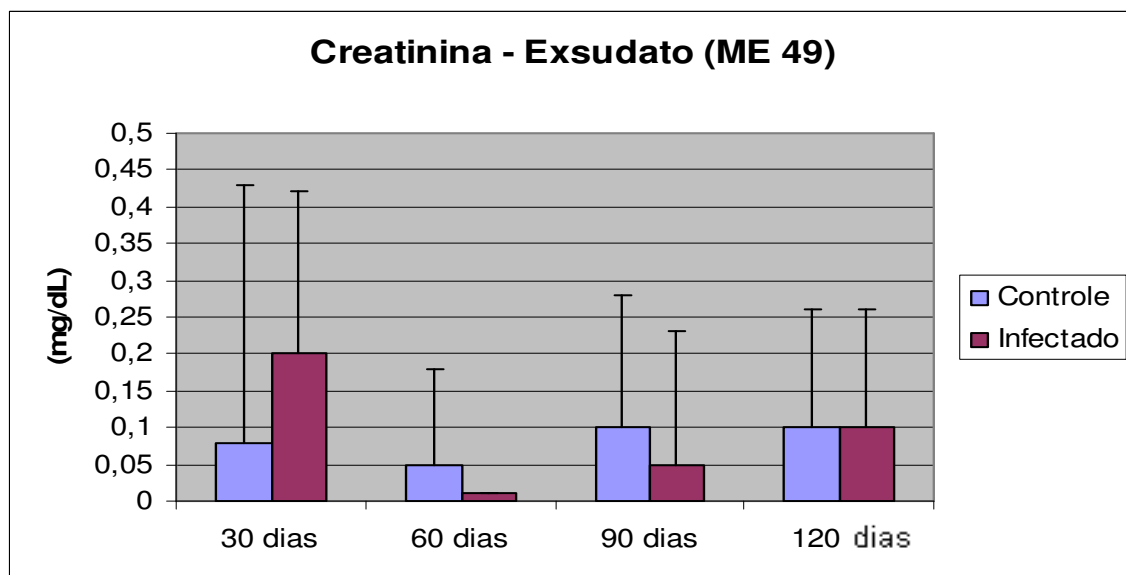


Figura 14: Concentrações da análise bioquímicas de creatinina no exsudato peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 e controles não infectados.

6- CONCLUSÕES

- Nos camundongos inoculados com a cepa RH, os níveis séricos de AST, ALT e DHL demonstraram alterações significativas, sugestivas de lesões hepáticas e em outros órgãos.
- Nos camundongos inoculados com cepa RH, no exsudato peritoneal os níveis de AST, ALT, GGT, FAL foram menores que no soro e somente na análise da DHL foi possível detectar alterações no quinto dia de infecção.
- Nos camundongos inoculados com a cepa ME-49, os níveis séricos de AST, ALT, FAL e DHL no soro demonstraram alterações significativas em todos os dias de análises, inferindo assim um comprometimento hepático e em outros órgãos.
- Nos camundongos inoculados com a cepa ME-49, dosados no exsudato peritoneal, não foi constatado alteração nos níveis de AST, ALT, GGT, FAL e DHL.
- Em camundongos inoculados com a cepa RH, dosadas tanto no soro como no exsudato peritoneal, não apresentou alterações nas concentrações de uréia e creatinina indicando.
- Em camundongos inoculados com a cepa ME- 49, não induziram alterações nos níveis séricos de creatinina, enquanto que os níveis séricos de uréia demonstraram alteração crescente de acordo com o progresso da infecção.

- Na cepa ME-49, a uréia e a creatinina no exsudato peritoneal manteve-se estável até no 120º dia em relação ao controle.
- Não foi possível detectar lesões renais utilizando-se somente metodologias automatizadas. Recomenda-se o acréscimo de outros exames (histopatológico), não se excluindo o potencial do parasito em causar lesão renal.

7- Referências Bibliográficas

Amendoeira MR 2001. Diagnóstico de la toxoplasmosis congênita – Temas de actualización. Rev Cubana Inves Biomed 20: 118-21.

Alessandro PM; Roberta Lemos Freire; Odilon Vidotto; Solange Maria Gennari; Elizabete Marangoni Marana; João Luis Garcia; Itamar Teodorico Navarro 2004. Avaliação dos testes de imunofluorescência indireta e aglutinação modificada para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos infectados experimentalmente. Pesq. Vet. Bras. vol.24 nº.4 Rio de Janeiro.

Aquino LPCT 2002. Aspectos hematológicos, bioquímicos e anatomopatológicos da infecção de *Trypanosoma evansi* em cães. Arq Bras de Med Veterinária, 54, p. 8-18.

Araujo BML; Lima SD; Daltro C 2005. Associação da gama-glutamil transferase e a síndrome metabólica em mulheres obesas. Arq Bras Endocrinol Metab vol.49 nº 4 São Paulo.

Avelino MM 2000. A gestação como fator de risco para a primo-infecção pelo *Toxoplasma gondii* [Tese Doutorado em Medicina]. Brasília: Universidade de Brasília 271 p.

Bahia – Oliveira LMG; Jones JL; Azevedo SJ; Alves CCF; Oréfice F; Addiss DG 2003. High endemic, Waterbone toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil.

Bartels H; Bohmer M 1971. Eine mikromethode zur kreatininbestimmung. Clin Chim Acta 32: 81 – 85.

Bastien P 2002. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 96: 205–215.

Boothroyd JC; Burg JL; Perelman D; Kasper LH; Ware PL 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol.141: 3584–3591.

Braunwald E; Fauci AS; Kasper DL; Hauser SL; Longo DL; Jamerson JL 2001. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15^o edição. New York, Ed McGraw-Hill.

Buchinder S; Blatz R; Rodloff AC 2003. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. Diagn Microbiol Infect Dis 45:269-271.

Camargo ME; Leser PG; Rocca A 1972. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescentes testes. A technique for specific results. Rev Inst Med Trop São Paulo 14: 310-313.

Camargo ME; Leser PG; Guarnieri DB; Rocca A 1977. Padronização de testes sorológicos para toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. Ver. Brás. Patol. Clin 13:1-5.

Camargo ME 2000. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças infecciosas e Auto-imunes. Guanabara Kooagan, Rio de Janeiro. p 278-288.

Camargo ME 2001. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editors. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p 278-286.

Câmara IA; Dias RVC; Soto-Blanco B 2007. Determinação das atividades séricas de creatina quina eqüinos de diferentes categorias de atividade. Arq Bras de Med Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 59, n. 1, p. 250-252.

Calvão AD 2002. Manifestações oftalmológicas na toxoplasmose congênita Niterói: Universidade Federal Fluminense.

Conley FK; Jenkins KA; Remington JS 2001. Toxoplasma. Arq. Inst. Biol São Paulo Jan/Jun 68: 13-17.

Contreras MD; Sandoval ML; Salinas P; Muñoz P; Vargas S 2000. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG/IgM/IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y crônica. Bol Chil. Parasitol 55: 1-10.

Couto JLA; Vieira RCS; Barbosa JM; Machado SS; Ferreira HS 2008. Alteração da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 41: 390-393.

Coutinho SG; Vergara TRC 2005. Toxoplasmose. In: Coura JR ed, Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p 816-829.

Chang ML 2005. Disproportional exaggerated aspartate transaminase is a useful prognostic parameter in late leptospirosis. World Journal of Gastroenterology, v.11, n.35: 5553-5556.

Chumpitazi BFP; Boussaid A; Pelloux H; 1995. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. J. Clin. Microbiol 33: 1479-1485.

Derourin F; Mazon MC; Garin YJF 1987. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 25(9):1597-1600.

Desmots G; Couvreur J 1974. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. The New England Journal of Medicine 290: 1110-1116.

Dias RAF; Freire RL 2005. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. Ciências Agrária, 26: 239-248.

Dubey JP; Frenkel JK 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of toxoplasma cysts. J Protozool 23: 537-554.

Dubey JP 1998. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. International journal for parasitology 28:1019 – 1024.

Dubey JP; Beattie CP 1988. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press Inc, 220.

Dubey JP 1993. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming of human and animals. In: Kreier, J.P. Parasitic protozoa. 2^a ed. San Diego: Academic Press 1-157.

Dubey JP; Gamble HR; Hill D; Sreekumar C; Romand S; Thuilliez P 2002a. High prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. J Parasitol 88: 1234 – 1238.

Dubey JP; Graham DH; Blackston CR; Lehman T; Gennari SM; Ragozo AA; Nishi SM; Shen SK; Kwok OH; Hili DE; Thuilliez P 2002b. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. Int J Parasitol 32: 99 – 105.

Dubey JP; Navarro IT; Sreekumar C; Dahl E; Freire RL; Kawabata HH; Viana MCB; Kwok OCH; Shen SK; Thuilliez P; Lehmann T 2004. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Paraná. Brazil: seroprevalence, tissue distribution and biological and genetic characterization of isolates. J Parasitol 90: 721 – 726.

Dubey JP 2006. Toxoplasmosis waterborne zoonosis. Rv. Veterinary Parasitology, Dec (1-2): 57 – 72.

Ellis JT 1998. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 28: 1053-1060.

Emanuelli MP; Lopes ATS; Maciel MR; Garmatz CB; Tavares OM 2008 Cinecia animal Brasileira, v.9, nº 1, p. 251-255.

Fabiny DL, Ertingshausen G 1971. Automated resction–rate method for determination of serum creatinine with centrifiChem. Clin Chem 17: 696 – 700.

Falangola MF; Petito CK 1993. Choroid plexus infection in cerebral toxoplasmosis in AIDS patients. Neurology 10: 2035-2040.

Feldman HA, Miller LT 1956. Serological study of toxoplasmosis prevalence. Am J Hyg 64: 320-335.

Frenkel JR; Dubey JO; Miller NL 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 167: 893 - 896.

FUNASA – Boletim eletrônico epidemiológico – P. 01-03, 20/08/2002.

Friendman and Young 1997. Effects of diseases on clinical laboratory tests, 3^a th ed. AACC Press.

Grover CM; Thulliez P; Remington JS; Boothroyd JC 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymease chain reaction and amniotic fluid. Journal of Clinical Microbiology 28: 2297-2301.

Gross U; Roos T; Appoldt D; Heeseman J 1992. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies agains P30 by using the immunoblot technique. J Clin Microbiol 30 (6): 1436-1441.

Hagiwara MK 2004. Leptospirose canina. Vet News, v.11, p.7-8.

Herrera HM 2001. *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. Veterinary Parasitology 102, p. 209-216.

Hinrichsen SL; Valente A; Rolim H; Jucá M 2005. Toxoplasmose. In: Doenças Infeciosas e Parasitárias. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p.421-427.

Howe DK; Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages. Correlation of parasite genotype with human diseases. J Infect Dis 172:1561 – 1566.

Hill D; Dubey J P2002. *Toxoplasma gondii*. Transmission diagnosis and prevention. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v.8, p.634-640.

Ho-Yen DO 1992. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. J Clin Pathol 45: 910-913.

Hutchinson WM 1965. Experimental transmission of *T. gondii*. Nature 206 961-962.

Hutchinson WM; Dunachie JF; Siim JC; Work K 1970. Coccidian like nature of *T. gondii*. Brit Med J 1:142.

Israelki DM; Remington JS 1988. Encefalite toxoplásmica em pacientes com AIDS. Clin Doenças Infec Parasit Amer Norte 2: 451-469.

James GS 1996. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *T. gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. J Clin Microbiol 34: 1572-1575.

Jones J L2001. *Toxoplasma gondii* infection in the United States seroprevalence and risk factors. American Journal of Epidemiology v.154, n.4, p.357-365.

Lassen ED 2004a. Veterinary hematology and clinical chemistry. Philadelphia Lippincott , p 417-550.

Lassen ED 2004b. Laboratory evaluation of the liver. In: Thrall MA Veterinary hematology and clinical chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins , p.355-377.

Lehninger AL; Nelson DL; Cox MM 2000. Lehninger princípios de Bioquímica. Savier Editora de livros Médicos Ltda. São Paulo. p 382.

Lin YL 2008. Seroprevalence and sources of *Toxoplasma* infection among indigenous and immigrant pregnant women in Taiwan. *Parasitol. Res* v.103, p. 67-74.

Kawazoe U 2005. *Toxoplasma gondii*. In Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA eds, *Parasitologia Humana*, Atheneu, São Paulo. p 163-172.

Khalifa KES; Roth A; Roth B 1994. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 32: 2813–2819.

Kompalic-Cristo A 2004. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 92-95.

Manual de Instruções de Uso do Sistema AXSYM Toxo IgG e IgM 2000, produzido por Abbott Laboratories, Estados Unidos.

Manual de Instruções de Uso do Sistema VIDAS Toxo IgM 1998, produzido por Bio-Merieux, S.A, França.

Meirelles RL 2001. Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo.

Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em saúde. Surto de Toxoplasmose no Município de Anápolis/GO, fevereiro de 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em 14 set. 2008.

Minho AP; Freire RL; Vidotto O; Gennari SM; Marana EM; Garcia JL; Navarro IT 2004. Avaliação dos testes de imunofluorescência indireta e aglutinação modificada para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos infectados experimentalmente. *Pesq. Vet. Bras.* vol.24 no.4 Rio de Janeiro.

Motta VT 2003. *Princípios e Interpretações de Bioquímica Clínica*. Ed. EDUCS.

Monzon CM; Villvicencio VI 1990. Serum protins in guinea-pigs and horses infected with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). *Veterinary Parasitology*, 36, p. 395-301.

Navarro CEK 1981. Serum biochemical changes in dogs with experimental *Leptospira Interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* infection. *American Journal of Veterinary Research*, v.42, p.1125-1129.

Pelloux H 1996. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 138: 11-15.

Philocreon GR 1976. *Toxoplasmose e gravidez: inquérito clínico-epidemiológico em gestantes de Goiânia [Tese de Doutorado].* Goiânia: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás. p121.

Pinkerton H; Weinman D 1940. *Toxoplasma* infection in man. *Arch Pathol, St. Louis* 30: 374.

Rantala AO; Lilja M; Kauma H; Savolainen MJ; Reunanen A; Kesäniemi YA 2000. Gamma-glutamyl transpeptidase and the metabolic syndrome. *J Intern Med* 248(3):230-8.

Remington JS; Macleod R; Desmots G 1994. *Toxoplasmosis*. In Remington JS, Klein J. *Infectious diseases of the new-fetus and born infant*. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders.

Remington JS; Macleod R; Desmots G 1995. *Toxoplasmosis*. In: Remington JS, Klein J. *Infectious diseases of the new-fetus and born infant*. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders. p140-267.

Remington JS; Thulliez P; Montoya JG 2004. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 42: 941-945.

Rigo RS; Rigo L; Honer; MR Honer 2009. Aspectos Clínicos e Laboratoriais na Leishmaniose Visceral Americana. *J Bras Nefrol*.

Rey L 2002. Toxoplasmose. In Rey L ed, Bases da Parasitologia Médica, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p 102-111.

Rosa C; Kasail N; Souza SLP; Guerra JL; Rego AA; Gennari SM 2001. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. Arq. Inst. Biol. São Paulo Jan/jun 68 (1): 13-17.

Sabin AB; Feldman HA 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science 108: 660-663.

Saiki RK 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.

Steven LS; Scott MS 2002. Urinary Sistem. Fundamental of veterinary clinical pathology. Iowa State p. 277-336

Spalding SM; Amendoeira MRR; Ribeiro LC; Silveira C; Garcia AP; Camillo-Coura L 2003. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 36: 483-491.

Spalding SM 2005. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo, v. 38, n.2, p.173-177.

Sternberger L; Hardy PH; Cuculis JJ; Meyer HG 1970. The unlabeled antibody method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (Horseadish peroxidase anti horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem. 18: 315.

Stryer L 1992. Bioquímica. Degradação de aminoácidos e ciclo da uréia. Guanabara. Rio de Janeiro p. 409 – 411.

Sobral CH; Amendoeira MRR; Teva A; Patel BN; Klein CH 2005. Seroprevalence of Infectan with toxoplasma gondii in indigenous brazilian populations. Am J. Trop. Hyg. 37 – 41.

Swenson MJ; Reece WO 1996. Dukes: Fisiologia dos animais domésticos. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Su C; Howe DK; Dubey JP; Ajioka JW; Sibley LD 2002. Identificarion of quantitative trait loci controlling acute virulence in Toxoplasma gondii. Proc Natl Acad Sei ESA 99: 10753 – 10758.

Suzuki Y 2002. Host resistance in the brain against Toxoplasma gondii. J Infect Dis 185 (Suppl. 1):S58 – 65.

Tender AM; Heckerroth A R; Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal Parasitology, v.30, p.1217-1258.

Tsunematsu Y; Shioiri K; Kusano N 1964. Three cases of lymphadenopathy toxoplasmic with special reference to the application of fluorescent antibody technique for detection of *Toxoplasma gondii* in tissue. J. Exp. Med. 34: 217-230.

Van Knapen F; Panggabeh SO; Van Leusden J 1985. Demonstration of Toxoplasma antigen containing complexes in active toxoplasmosis. J Clin. Microbiol. 22: 645-650.

Weber MZ; Muccioli C; Beliort Jr R 2005. Acometimento ocular em pacientes com AIDS e toxoplasmose do sistema nervoso central antes e depois de HAART. Arq Brás. Oftalmologia, 68(6): 773 – 5

Weiss LMI 1991. Sensitive and specific detection of Toxoplasma DNA in an experimental murine model: use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaction. J Infect Dis. 163: 180-186.

Wolf A; Cowen D 1939. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis): a new protozoan disease of man. Bull Neurol Inst NY 6: 307.

Wong SY, Remington JS 1993. Biology of *T. gondii*. AIDS 7: 299-316.

Young DS 1997. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3 th ed. AACCPress.