

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

**FABIANA SANTIAGO ALEIXO ALVES**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO  
DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS NA REATIVAÇÃO DA  
TOXOPLASMOSE CRÔNICA EM MODELO MURINO COM A CEPA ME 49 NO  
CAMUNDONGO BALB/c**

**Orientador:**

**Prof. Dr. MARCO TULIO ANTONIO GARCIAZAPATA**

**Dissertação de mestrado.**

**Goiânia-GO, 2008.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

## **TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

### **E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### **1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação       Tese

#### **2. Nome completo do autor**

**FABIANA SANTIAGO ALEIXO ALVES**

#### **3. Título do trabalho**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS NA REATIVAÇÃO DA TOXOPLASMOSE CRÔNICA EM MODELO MURINO COM A CEPA ME 49 NO CAMUNDONGO BALB/c**

#### **4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo**

**autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Marco Tulio Antonio Garciazapata, Professor do Magistério Superior**, em 17/05/2021, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Santiago Aleixo Alves, Usuário Externo**, em 18/05/2021, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2067381** e o código CRC **9958031A**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.024335/2021-28

SEI nº 2067381

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

FABIANA SANTIAGO ALEIXO ALVES

AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO  
DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS NA REATIVAÇÃO DA  
TOXOPLASMOSE CRÔNICA EM MODELO MURINO COM A CEPA ME 49 NO  
CAMUNDONGO BALB/c

Orientador:

Prof. Dr. Marco Tulio Antonio GarciaZapata

Co-orientadores:

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

Prof<sup>a</sup>. Dra. Joanna Darc Aparecida Herzog Soares

Dissertação submetida ao  
PPGMT / IPTSP/ UFG como requisito  
parcial para a obtenção do Grau de **Mestre**  
em Medicina Tropical na área de  
concentração de **Parasitologia**.

Goiânia-GO, 2008.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Alves, Fabiana Santiago Aleixo

Avaliação clínica, laboratorial e histopatológica do efeito de drogas imunossupressoras na reativação da toxoplasmose crônica em modelo murino com a cepa ME 49 no camundongo BALB/c [manuscrito] / Fabiana Santiago Aleixo Alves. - 2008.

x, 67 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Tulio Antonio Garciazapata; co orientador Dr. Ruy de Souza Lino Junior; co-orientador Dr. Joanna Darc Aparecida Herzog Soares.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2008.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Toxoplasmose. 2. Drogas imunossupressoras. 3. Modelo murino. I. Garciazapata, Marco Tulio Antonio , orient. II. Título.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE FABIANA SANTIAGO ALEIXO ALVES** – Aos vinte e oito dia do mês de março do ano de 2008 (28/03/2008), às 09h:00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **MARCO TÚLIO ANTÔNIO GARCÍA ZAPATA** (IPTSP/UFG), **ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA** (ICB/UFG) e **MARA SILVIA CARVALHAES** (IPTSP/UFG), para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS NA REATIVAÇÃO DA TOXOPLASMOSE CRÔNICA EM MODELO MURINO COM A CEPA ME 49 NO CAMUNDONGO BALB/c”**, em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **PARASITOLOGIA**, de autoria de **FABIANA SANTIAGO ALEIXO ALVES**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Profa. Dra. **MARIA DE FÁTIMA COSTA ALVES**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho passando em seguida a presidência da sessão ao orientador da Mestranda, Prof. **MARCO TÚLIO ANTÔNIO GARCÍA ZAPATA**. A palavra a seguir, foi concedida a autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 622/2004 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Túlio Antônio García Zapata  
Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda  
Profa. Dra. Mara Silvia Carvalhaes

### Aprovada / Reprovada

Aprovada  
Aprovada  
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Habilitada**, (**Habilitada** ou **não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRA EM MEDICINA TROPICAL**, área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11h e 19 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora internos à UFG e pela Profa. Dra. **REGINA MARIA BRINGEL MARTINS**, atual coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, representando o membro externo.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Marco Tulio Antonio Garciazapata, Professor do Magistério Superior**, em 22/05/2021, às 00:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisângela De Paula Silveira Lacerda, Professor do Magistério Superior**, em 11/06/2021, às 22:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Regina Maria Bringel Martins, Coordenadora de Pós-Graduação**, em 14/06/2021, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2085055** e o código CRC **E298AFD8**.

Referência: Processo nº 23070.024335/2021-28

SEI nº 2085055

Para minha querida avó Dagmar da Silveira  
Santiago (*in memoriam*), que estará em meu  
coração por toda a minha vida

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar vida e saúde, a minha Santa Bárbara por me dar coragem e força para ultrapassar mais essa fase de minha vida.

Ao professor Marco Túlio Antônio Garcia-Zapata que aceitou me orientar sem mesmo me conhecer e compreendeu meus momentos de insatisfação e desespero;

A professora Joanna D'arc Aparecida Herzog Soares por me aceitar em seu laboratório e por participar da minha pesquisa;

Ao professor Ruy de Souza Lino Junior pela sua organização, disposição para ajudar, trabalhar, além do e bom senso, sua contribuição foi meu pilar;

Ao nosso amigo Fábio de Faria Vasconcelos, que me orgulho muito em ter tido como estagiário e que apesar da pouca idade é um profissional responsável e dedicado, e espero que nossa amizade vença as barreiras geográficas;

A minha amiga Vânia Beatriz que trabalhou arduamente para me ajudar e soube com muita sabedoria me ensinar técnicas do laboratório e de vida;

A Iracy e a todos os amigos do biotério obrigado pela atenção e carinho em tantos momentos desse trabalho;

Ao José Clementino (Zezinho) e a Kariny da secretaria de pós-graduação, muito obrigado pela atenção despendida não só a mim, mas a todos sem distinção;

A todos os professores do IPTSP-UFG em especial aos professores, Wolf Christian Luz, Adelair Helena dos Santos, Cleomines, Ana Maria de Castro, Ana Paula Kipnis pela orientação e ajuda em tantos momentos de dúvida;

A todos da família IPTSP-UFG pela oportunidade da realização de um sonho, espero poder ter retribuído a altura.

## DEDICATÓRIA

A minha avó Dagmar da Silveira Santiago que manteve sua coerência até seus últimos momentos de lucidez;

A minha paixão, amor, marido, amigo e professor Eduardo da Costa Alves, obrigada pela dedicação que em uma só vida não terei como retribuir, te amo muito;

A minha mãe Édila Santiago que soube aceitar o caminho que resolvi traçar;

As minhas tias Vilma Santiago e Rosangela Santiago Dias que souberam compreender minha ausência em tantos momentos difíceis e pelo seu apoio incondicional;

A minha amiga Liliane Rego pela sua ajuda e carinho e por momentos inesquecíveis com sua linda e especial família;

Aos meus amigos de laboratório Edson Sidião, Zilma Dourado, Sônia, Patrícia pela carinhosa acolhida no laboratório e em seus corações, nunca os esquecerei.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Histórico.....	2
1.2. Aspectos da biologia básica de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	3
1.2.1. O ciclo do parasito.....	3
1.2.2. Ciclo nos hospedeiro definitivo e intermediário.....	3
1.2.3. Formas infectantes.....	5
1.2.4. Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
1.2.5. Epidemiologia da toxoplasmose.....	11
1.3. Alterações patológicas na toxoplasmose.....	12
1.4. Modelo animal de toxoplasmose.....	14
1.5. Diagnóstico clínico e laboratorial.....	15
1.6. Terapia imunossupressora.....	17
<b>2. OBJETIVOS DO TRABALHO.....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivos gerais.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
<b>3 . MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1. Aspectos gerais.....	20
3.2. Área e local do estudo.....	20
3.3. Modelo utilizado.....	20
3.3.1. Agente infeccioso.....	20
3.3.2. Modelo animal experimental.....	21
3.3.3. Análise estatística.....	21

3.3.4. Procedimentos utilizados.....	21
3.3.5. Divisão por Grupos que receberam as drogas imunossupressoras.....	25
3.3.6. Manutenção da cepa.....	26
3.3.7. Contagem dos cistos.....	27
3.4. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	27
3.4.1. Punção intra-cardíaca .....	27
3.4.2. Realização da RIFI .....	27
3.4.3. Avaliação histopatológica .....	28
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
4.1. Estabelecimento da infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	29
4.1.1. Mortalidade de animais e contagem de cistos.....	29
4.1.2. Sorologia por Reação de Imunofluorescência Indireta de todos os camundongos sobreviventes.....	30
4.2. Terapia imunossupressora.....	32
4.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta do soro dos animais controle .....	32
4.2.2. Reação de Imunofluorescência Indireta do soro dos animais submetidos ao tratamento imunossupressor.....	33
4.2.3. Avaliação clínica de camundongos tratados com drogas imunossupressoras.....	36
4.2.4. Sobrevivência.....	36
4.2.5. Sintomatologia.....	37
4.3. Análise histopatológica .....	40
4.3.1. Estudo histopatológico de órgãos de camundongo.....	40
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
6.1. Recomendações e sugestões.....	46
6.2. Análise e aceitação dos trabalhos.....	46
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>47</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome)
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Ensaio Enzimático de Imunoabsorção
EUA	Estados Unidos da América
HE	Hematoxilina-Eosina
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IgA	Imunoglobulina da classe A
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
INF- $\gamma$	Interferon gama
NK	Natural killer
PCR	Cadeia da polimerase
RFLPs	Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SNC	Sistema nervoso central
TV	Transmissão vertical
UFG	Universidade Federal de Goiás

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo do <i>Toxoplasma gondii</i> , com suas várias formas de infecção para o homem .....	04
FIGURA 2: Taquizoítos em macrófagos.....	07
FIGURA 3: Diversas formas evolutivas de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	08
FIGURA 4: Cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em tecido cerebral de camundongo.....	09
FIGURA 5: Cisto de <i>Toxoplasma gondii</i> 100 dias após inoculação.....	09
FIGURA 6. Procedimento de administração de material por via oral(gavagem) em camundongo BALB/c.....	26
FIGURA 7: Organograma dos procedimentos adotados para o estabelecimento da infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos BALB/c.....	28
FIGURA 8: Organograma dos procedimentos realizados com drogas imunossupressoras e seus respectivos controles.....	29
FIGURA 9. Punção cardíaca em camundongo BALB/c.....	33
FIGURA 10. Início de Necropsia em camundongo BALB/c.....	35
FIGURA 11. Camundongo BALB/c infectado com cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> que receberam tratamento com a associação de Dexametasona+Azioprina+Acetato de Cortisonado (Grupo 4) com alteração epidérmica semelhante alopecia.....	40
FIGURA 12. Foto comparativa entre os camundongos com quadro semelhante a alopecia (Grupo 4) com camundongos tratado com associação das três drogas e não infectado(Grupo controle 2 ).....	41
FIGURA 13: Organograma apresentando o resultado clínico do estabelecimento da infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	41
imunofluorescência indireta, utilizando-se conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína.....	32

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: Sorologia dos camundongos sobreviventes comparativa com o número de cistos inoculados (curva de virulência).....	31
TABELA 2: Sorologia em camundongos do grupo controle três para estabelecimento de parâmetro sorológico de camundongos BALB/c infectados pela cepa do <i>Toxoplasma gondi</i> .....	33
TABELA 3: Sorologia dos grupos de camundongos BALB/c infectados com a cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> e tratados em modelo com drogas imunossupressoras propostas..	34
TABELA 4: Tabela comparativa da presença de sintomatologia apresentada por camundongos BALB/c infectados por <i>Toxoplasma gondii</i> (via oral), tratados ou não com imunossupressores.....	39

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o potencial de reativação da Toxoplasmose em modelo murino imunocomprometido, que mimetiza à imunossupressão para tanto foi utilizado camundongos BALB/c(40dias), foram infectados com 20 cistos da cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*, e após 60dias foi iniciado o tratamento com drogas imunossupressoras (Azatioprina, 10mg/kg, cinco vezes por semana em dias seguidos; Dexametasona, 2.5mg/kg por dia, por camundongo, três vezes por semana em dias alternados; Acetato de cortisona em 50mg duas vezes por semana em injeção subcutânea de acetato de cortisona sozinho ou associado com seus devidos controles). O tratamento foi mantido por 28 dias. O uso da Dexametasona ou da azatioprina isoladas ou associadas, não causou um fator de reativação por exames sorológicos, histopatológicos ou clínico, porém associadas ao acetato de cortisona levou a um diagnostico clínico associativo a um quadro de reativação, devido a lesões epidérmicas em 62,5% dos camundongos desse lote em comparação com seus devidos controles, contudo não foi observada mortalidade em nenhum dos grupos testados.

Palavras-chave: Toxoplasmose, drogas imunossupressoras, modelo murino

## ABSTRACT

This work was evaluated for the potential reactivation of Toxoplasmosis in murine model similar to human immunosuppression being developed in BALB / c mice, which were 40 days infected with 20 cysts of ME49 strain of *Toxoplasma gondii* and after 60 days was initiated treatment with immunosuppressant drugs, Azathioprine in dosage of 10mg/kg five times a week in days, Dexametasone in dosage 2.5mg/kg per day per mouse, three times per week on alternate days, Cortisone acetate in 50mg twice a week in subcutaneous injection of cortisone acetate alone, or associated with its proper controls. Treatment was continued for 28 days. The use of the Dexametasona or Azathioprine isolated or associated with, a factor not caused by reactivation of serological tests, clinical or histopathological but associated with cortisone acetate led to a clinical diagnostic framework of a voluntary recall because of injuries in epidermal 62.5% of the mice that lot compared to its proper controls, however mortality was not observed in any of the groups tested.

Key words: Toxoplasmosis, immunosuppressive drugs, murine model

## 1.INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito comum no homem e em muitos outros animais de sangue quente. Os gatos domésticos e outros felídeos atuam como hospedeiros definitivos, e são capazes de disseminar oocistos de *T. gondii* através de suas fezes (Tenter et al 2000; Dubey & Odening 2001). A contaminação dos mesmos ocorre após a ingestão de cistos teciduais de animais infectados ou através de oocistos presentes no solo, o qual constitui uma fonte contínua de infecção para humanos e animais (Devada et al 1998). Após a ingestão dos oocistos ocorre a liberação dos esporozoítas que infecta o epitélio intestinal do hospedeiro intermediário, produzem as formas assexuadas de taquizoítos, ocorrendo assim uma infecção aguda e talvez, posteriormente uma infecção crônica com o desenvolvimento das formas taquizoíticas em bradizoítas. Os taquizoítos penetram em células nucleadas, multiplicam-se rapidamente (taks= rápido em grego), rompendo a célula hospedeira e liberam taquizoítos, que infectam as células adjacentes causando uma infecção sistêmica, e logo após alguns dias ocorrerá a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos que será outro estágio do parasito podendo permanecer viáveis por vários anos, muitas vezes por toda a vida do hospedeiro (Frenkel 1996; Kawazoe 2003, Dubey et al 1998a, Dubey 2004).

Observa-se neste parasito vasta distribuição geográfica e excepcional resistência, atravessando grandes distâncias (aves migratórias) e persistindo as adversidades ambientais como a variação de temperatura e umidade, permitindo-nos prever que o mesmo apresentaria alta diversidade genética (Sibley & Boothroyd 1992). Porém, surpreendentemente o parasito parece reproduzir clonalmente apresentando uma diversidade genética consideravelmente baixa entre as linhagens de *T. gondii* isoladas (Dardé et al 1992; Sibley & Boothroyd 1992; Lehmann et al 2000). Diferentes cepas têm sido isoladas e são, geralmente, classificadas como virulentas ou avirulentas com base na sua patogenicidade e/ou antigenicidade para modelo experimental com camundongo, que por sua vez será resistentes ou susceptíveis (Ferreira 2005). Uma das cepas mais usadas como padrão na comparação entre as cepas e a cepa RH que foi isolada em 1939 de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmica, tendo como principal critério para avaliar sua virulência a porcentagem de mortalidade e em outro lado temos as cepas avirulentas como a ME49 que foi isolada da musculatura de carneiro (Ferreira 2005). Na infecção em indivíduos imunocompetentes, com uma breve fase aguda caracterizada pela proliferação de taquizoítos convertida em um estágio latente caracterizado por um lento crescimento de bradizoítas no

interior de cistos teciduais, localizados principalmente no cérebro e músculo esquelético (Djurkovic-Djakovic et al 2001) Contudo, se o balanço entre as defesas imunes do hospedeiro e o parasito, sofrerem um desequilíbrio, uma nova proliferação do parasito pode ocorrer levando a uma reativação de uma infecção crônica (Porter & Sande 1992). Com o surgimento da AIDS e o uso de terapias imunossupressoras intensas para tratamento de doenças malignas ou sistêmicas, bem como, no tratamento pré/pós transplantes de órgãos e tecidos, tem-se estabelecido uma população de indivíduos imunocomprometidos suscetíveis a reativação de patógenos oportunistas, incluindo o *T. gondii* (Bernsteen et al 1999). As Infecções por *T. gondii* tem sido relatadas em pacientes transplantados que receberam coração (Anthuber et al 1991), rim (Renoult et al 1991), fígado (Kusne et al 1986) e medula óssea (Derouin et al 1992). Estas foram provavelmente devido à reativação de cistos latentes de *T. gondii* nos pacientes receptores, embora infecção primária possa ser causada por transmissão do parasito em transplante de órgãos (Renoult et al 1991).

### 1.1. Histórico

O *T. gondii* foi descoberto em 1908, simultaneamente, por Alfonso Splendore, no Brasil em São Paulo, de forma independente, em coelhos por Nicole & Manceaux, em um roedor, *Ctenodatylylus gondi*, no Instituto Pasteur da Tunísia no norte da África. Na ocasião estes pesquisadores acharam tratar-se de um membro do gênero *Leishmania* e o batizaram de *Leishmania gondii* (Janku 1923; Veronesi 2002).

Nicolle e Manceaux 1909 caracterizaram o parasito como uma nova espécie batizando-o de *Toxoplasma gondii*. O nome *Toxoplasma* é derivado de sua forma crescente (toxon= arco e plasma= forma, em grego) e *gondii* deriva do nome do roedor onde primeiro foi identificado. A descoberta quase que ao mesmo tempo do parasito em dois continentes e em duas espécies diferentes de hospedeiros, permitiu prever a ampla distribuição geográfica e a grande variedade de hospedeiros do novo protozoário no reino animal (Amato Neto et al 1995). As primeiras implicações em humanos datam de 1923, quando foi associado a cistos oculares em uma criança de 11 anos com hidrocefalia, por Janku em Praga. Pouco tempo depois no Rio de Janeiro em 1927, Torres relatava a presença do parasito em cortes histológicos de musculatura cardíaca, esquelética e de cérebro de recém-nascido falecido com 29 dias de vida, especulando que doença poderia ter uma possível forma de transmissão congênita. Levaditi et al 1928 foram os primeiros a descrever os cistos teciduais como estágio

persistente do parasito. Pinkerton & Weinman 1940 foram os primeiros a relatar um caso de morte por toxoplasmose disseminada em um adulto humano. (Weinman & Chandler 1954). Foi observado por Dardé 1992, Howe et al 1995, Sibley et al 1992 uma população com uma estrutura altamente clonal e observadas variações substanciais na progressão e severidade da infecção toxoplásmica, estas diferenças têm sido atribuídas a fatores genéticos do hospedeiro e do parasito (Mcleod et al 1989; Suzuki et al 1991; Suzuki et al 1996; Robert et al 1996) e não obstante a oportunidade de recombinação durante o ciclo sexuado, foi observada em microrganismos com populações clonais (Dardé 1992; Sibley et al 1992; Howe et al 1996). A partir da década de 80 com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi caracterizada a encefalite toxoplásmica como a manifestação mais comum, e demonstrando notáveis números entre os portadores dessa virose (Iescano et al 2004) os primeiros relatos dessa associação ocorreram por Luft et al 1984 que relatou o primeiro caso de toxoplasmose do sistema nervoso central num paciente aidético. Nestes indivíduos, o quadro de toxoplasmose aguda geralmente é resultado da reativação de uma infecção crônica (Porter & Sande 1992), e no caso de uma primoinfecção em indivíduo imunocomprometido, a toxoplasmose geralmente apresenta-se com na forma de doença pulmonar e encefalite difusa (Luft 1989). O período de incubação pode variar conforme, idade, sexo, doença de base, e o tipo de forma evolutiva do parasito que foi ingerida, como em Bonametti et al que estudou um surto pela ingestão de carne crua, com essas variantes e observou o período de incubação entre 6 a 13 dias com o aparecimento de sintomas menos específicos como febre, mialgia, cefaléia adenomegalia e mais característicos como Hepatomegalia, esplenomegalia, exantema.

### **1.1.2. Modelo animal em estudos experimentais**

O modelo experimental em animais, ou melhor, modelo humano de doença foi inicialmente estudada por Claude Bernard, por volta de 1865, em seus estudos de fisiologia que lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana (Fagundes et al 2004). Após este marco outros trabalhos pioneiros foram desenvolvidos como Jenner que testou a sua hipótese da vacinação a partir de seus conhecimentos da doença no gado leiteiro, Pasteur que testou a sua teoria da imunização da raiva a partir de macerado do cérebro de um cão raivoso, Kock que estabeleceu de forma cabal e inequívoca, pela primeira vez na história, a relação causal entre um agente

microbiológico e uma doença, estudando o carbúnculo que afetava o gado (Nunn 1996, Rutkow 1993, Lyons et al 1987). A opção por um modelo animal pode se fazer explicar por aspectos éticos, por ser menos oneroso comparado com modelos em humanos que além do custo poderam demandar mais tempo, maior número de amostra ou a até mesmo fatores ligados a doença em questão podendo vir a ter uma baixa incidência ou prevalência, dificultando o numero de casos, além disso ainda existe a possibilidade da doença estudada ser de grande virulência. Contudo podemos destacar que em modelos com o uso de animais ocorre a necessidade de grupos controles e a escolha de um tratamento padrão ou até mesmo o uso eventual de um placebo (Levin 1987, Fletcher et al 1996). Deve-se manter um enorme cuidado com a extrapolação de resultados de experimentos sobre espécies não-humanas para humanos, pois carrega controvérsias suficientes para décadas de pesquisa. O que é nocivo ou ineficaz para espécies não - humanas pode ser inócuo ou eficiente em humanos. Por exemplo, a penicilina é fatal para porcos da Índia, mas geralmente bem tolerada por seres humanos; a aspirina é teratogênica em gatos, cães, porcos da Índia, ratos, camundongos e macacos, mas obviamente não para mulheres grávidas, com um consumo freqüente. A talidomida, que deformou 10.000 crianças, não causa defeitos de nascimento em ratos ou muitas outras espécies, mas o faz em primatas (Salén et al 1995). Para a realização da escolha de um modelo animal a ser utilizado ficamos tentados a pensar o quanto à espécie se assemelha ao modelo humano, toda via a proximidade filogenética não garante sucesso do modelo, como realizado com chimpanzé em pesquisa com o vírus da AIDS (Salén 1995, Lynette 1998) Da mesma forma, é decisivo que os fenômenos patológicos e o resultado de uma doença ou afecção induzida na espécie testada se pareça com os respectivos fenômenos patológicos na espécie alvo (Salén 1995, Lynette 1998). Quando o modelo experimental envolve drogas e toxina deve-se levar em relevância o metabolismo do animal em questão, como no caso de pequenos roedores que possuem metabolismo muitas vezes mais rápido do que o de humanos, com órgãos viscerais que controlam e exercem o metabolismo, desempenhando um crescimento mais devagar do que o tamanho corporal como um todo. Ressaltando que o metabolismo relaciona-se com aproximadamente 2/3 da potência do peso corporal total (o chamado peso corporal metabólico). Levando a calcular doses experimentais de acordo com o peso corporal metabólico (Calabrese 1991).

## 1.2. Aspectos da biologia básica do *T. gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um parasito pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma* e espécie única *Toxoplasma gondii* (Kawazoe 2003), apresenta um processo vital complexo com dois tipos de hospedeiros e ciclos (Antunes 1984). O ciclo de vida pode ser dividido em duas fases: no hospedeiro intermediário ocorre apenas o ciclo assexuado da reprodução, enquanto que no hospedeiro definitivo (felinos) primeiramente ocorre uma fase assexuada seguida posteriormente por uma fase sexuada de reprodução (Kawazoe 2003). É um parasito intracelular que invade a célula hospedeira, evitando sua destruição pelo sistema imune (Volker et al 2001). A célula infectada, entretanto, tem a capacidade de opor-se à invasão do patógeno iniciando sua própria morte, num processo chamado morte celular programada ou apoptose (Volker et al 2001), no qual células apoptóticas são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos. Este mecanismo de defesa do hospedeiro representa forte pressão seletiva sobre os parasitos. Em geral, a infecção por *T. gondii* induz a uma resposta imunológica potente e protetora, que é insuficiente para eliminar completamente o parasito (Denkers et al 2004); que desenvolve estratégias para modular o programa apoptótico a seu favor. O *T. gondii* faz parte do grupo de parasitos que inibem a apoptose das células hospedeiras, ganhando mais tempo para sua replicação (Moss et al 1999).

### 1.2.1. O ciclo do parasito

O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida que pode ser dividido em duas fases, uma em um hospedeiro intermediário e outra em um hospedeiro definitivo (Figura 1), sendo os felinos os hospedeiros definitivos e o homem e os demais animais de sangue quente considerado hospedeiros intermediários (Dubey et al 1998b, Kawazoe 2003).

### 1.2.2. Ciclo no hospedeiro definitivo

O hospedeiro definitivo do *Toxoplasma gondii* são os felinos, neste o protozoário iniciará sua infecção pela invasão as células do intestino delgado devido ao rompimento de cistos teciduais em carne ingerida, onde se dará o início ao ciclo enteroepitelial (reprodução sexuada do parasito) (Dubey et al 1998b, Frenkel et al 1970). Alguns penetram na lâmina própria intestinal e multiplicam-se como taquizoítos que farão o ciclo assexuado no hospedeiro definitivo, outros por sua vez, penetram nas células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento de numerosas gerações assexuadas chamadas esquizontes (Dubey & Frenkel 1972). Em seguida são formados gametas masculinos (microgametas, móveis, biflagelados) e femininos (macrogametas, imóveis), após a fertilização dos macrogametas pelos microgametas, inicia-se a formação da parede do oocisto ao redor do gameta fertilizado. Quando o oocisto está maduro, é liberado no lúmen intestinal, via ruptura das células do epitélio. Posteriormente o oocisto é liberado nas fezes ainda não esporulado, sofrendo o processo de esporulação no meio externo dentro de 1-5 dias dependendo das condições ambientais (Dubey 1998a; Dubey 2004).

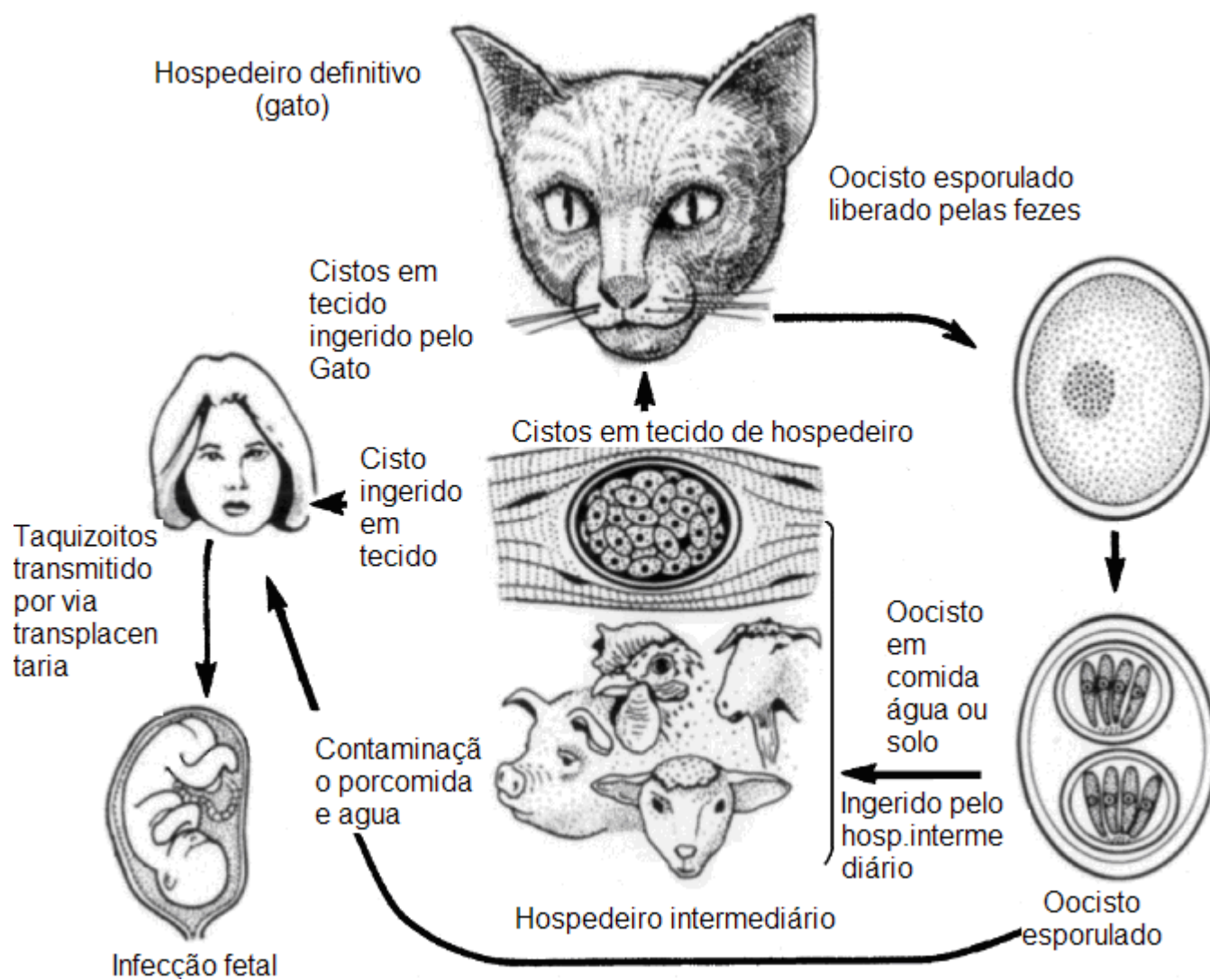


Figura: 1- Ciclo do *T.gondii*, com suas várias formas de infecção para o homem. (Hill and Dubey 2002)

### 1.2.3. Ciclo no hospedeiro intermediário

O *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório que desenvolveu diversas vias potenciais de transmissão, sendo capaz de infectar provavelmente todos os animais de sangue quente, tornando-se um dos protozoários parasitas mais bem sucedidos (Tenter et al 2000; Boothroyd & Grigg 2002).

Após a infecção com qualquer forma infectante do parasito, desenvolve-se em taquizoítos, que se dividem rapidamente por sucessivas endodiogenias dentro de diferentes células hospedeiras, o tempo de cada divisão é de seis a oito horas para uma cepa virulenta (cepa tipo I) (Kasper & Boothroyd 1992). Após rápida passagem pelo epitélio intestinal ira penetrar em células nucleadas do organismo formando o vacúolo parasitóforo, dando continuidade a multiplicação por endodiogenia (Dubey 2004) quando o número de taquizoítos intracelulares aproxima-se de 64-128, a célula é rompida liberando os parasitas que passam a invadir as células adjacentes, esta fase é conhecida como fase aguda da infecção. Dentro de aproximadamente dez dias a maioria dos taquizoítos são destruídos pela resposta imunológica humoral e celular do hospedeiro, pela produção de células B que produzem imunoglobulinas das classes M, G, A e E contra antígenos de *T. gondii*, estas na presença de complemento permitem a lise de taquizoítas extracelulares (Bhopale 2003; Schreiber & Feldman 1980) não possuindo ação entretanto sobre os parasitas intracelulares (Roberts & Mcleod 1999). Após o surgimento da imunidade específica, os taquizoítos desaparecem dos tecidos, permanecendo viáveis sobre a forma de bradizoítos que são formas parecidas com os taquizoítos, porém, de multiplicação lenta, estando dentro de cistos teciduais (Kawazoe 2003; Frenkel 1996). Estes cistos não podem ser destruídos pelo sistema imune e podem permitir a reagudização de um quadro crônico de toxoplasmose, se houver alguma ruptura do equilíbrio imune (Roberts & Mcleod 1999; Filisetti & Candolfi 2004), podem permanecer viáveis por toda a vida do hospedeiro possuindo alta afinidade por tecidos nervosos (olhos e cérebro) e musculares (esquelética estriada e cardíaca) (Dubey & Beattie 1988; Dubey 1998 a; Tenter et al 2000, Dubey 2004).

#### 1.2.4. Formas oocísticas

A forma oocística faz parte do ciclo assexuado do parasito, tendo início pela ingestão do parasito na forma de cisto tecidual por felinos resultando nas formas de macro e microgametas, a fusão dos gametas produz um zigoto, que secreta uma membrana cística rígida, que é eliminada juntamente com as fezes do felino como oocistos não esporulados. Durante a fase aguda um felino pode liberar até 100 milhões de oocistos por dia (Montoya & Liensefeld 2004).

Após 1 a 5 dias de exposição ao ar e a temperatura ambiente os oocistos esporulam e produzem dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítas (Dubey et al 1997). Então tais oocisto se tornam altamente infectantes e viáveis por muitos anos no solo até serem ingeridos pelo hospedeiro intermediário, liberando esporozoítos que invadem o epitélio intestinal e produzem a forma assexuada do parasito os taquizoítos que iram desencadear a forma aguda a doença.

#### 1.2.5. Formas taquizoíticas

Possuem o formato de um arco e apresenta em média 6,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2,0  $\mu\text{m}$  de largura (Neves 2003; Dubey et al 1998a). Quando observados em microscopia eletrônica, visualiza-se um complexo apical anterior constituído por um anel conóide de fibras, espiraladas, róptrias e micronemas, que estão envolvidos no processo de penetração celular do parasito e também, ao centro, o núcleo, as mitocôndrias, o aparelho de Golgi e os microtúbulos (Dubey et al 1998a) (Figura.2).As formas taquizoíticas exigem um hábitat intracelular para sobrevivência e multiplicação, que quando contínua conduz à ruptura das células e liberação de tais formas que invadem outras células ou são fagocitadas e transportadas para outras áreas do corpo através do sangue e linfa (Dubey et al1998b). Taquizoítos são vistos na infecção primária ou reativadas, e sua presença é a marca de infecção aguda (Weinrach et al 1954). Este processo leva a uma forte reação inflamatória e destruição tecidual, causando as manifestações clínicas da toxoplasmose, (Montoya & Liesenfield 2004).

Por causa de variações osmóticas os taquizoítos são as formas menos resistentes do parasito, sendo facilmente destruídos pelas condições ambientais, ou pelo suco gástrico.

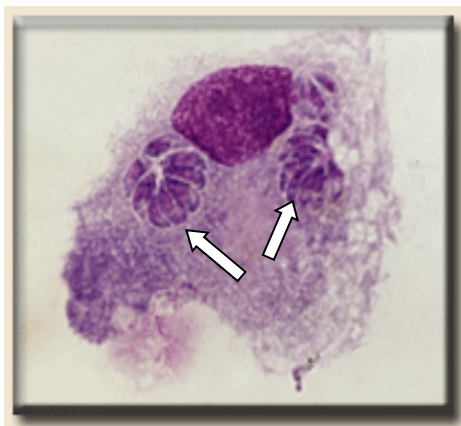


FIGURA 2- Tachizoítos em macrófagos : 2 formas em roseta corado em Giemsa.Fonte: Dubey et al 2005.

### 1.2.6. Formas Bradizoíticas e císticas

O bradizoíto é, morfologicamente, muito similar ao tachizoíto(Figura 3), porém permanece no interior do cisto e multiplica-se lentamente. Essa reprodução lenta do bradizoíto, também por endodiogenia, representa uma forma evolutiva do ciclo iniciada conforme o controle da infecção pelo sistema imunológico do hospedeiro, resultando na formação de grandes aglomerados parasitários, ou seja, alguns tachizoítos invadem as células e, após a proliferação inicial, desenvolvem uma cápsula cística na parede do vacúolo parasitóforo, diminuindo o seu metabolismo e transformando-se em bradizoítos, que pela constante resposta imunológica permanecem no interior do cisto sem despertar sintomatologia significativa no hospedeiro por meses e até mesmo anos (Amato neto et al 1995). Biologicamente, os bradizoítos se diferenciam dos tachizoítos pelo fato dos primeiros sobreviverem ao processo digestivo no estômago, enquanto o mesmo não ocorre com os tachizoítos. Os bradizoítos apresentam um depósito maior de açúcar sob a forma de grânulos de glicogênio, alguns vacúolos e um núcleo situado nas proximidades do pólo posterior (Dubey et al 1998b). Em modelos experimentais foram demonstrados que cistos teciduais são formados entre 5 e 6 dias pós- infecção oral com bradizoítos em camundongos e entre 6 e 7 dias pós infecção oral com oocistos (Dubey et al 1997).

Nas formas císticas a variação da localização tecidual pode causar uma variável na forma, mas geralmente é redondo, medindo entre 20 e 200  $\mu\text{m}$  (Dubey et al 1998b) (Figura 3-c). Os cistos possuem membrana dupla sendo resistentes a enzimas proteolíticas e a resfriamento a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 dias (Amato Neto et al 1995) Acredita-se, que, fatores relacionados ao desenvolvimento da imunidade induzem a formação de cistos tissulares (Dubey et al 1998b),

como temperatura mais elevada e óxido nítrico (Lyons et al 2002) Admite-se que o cisto não permite a penetração de agentes medicamentosos ativos ou a atuação de anticorpos, e, por outro lado, impedem a saída de produtos metabólicos desencadeadores de inflamação local. Tais fatos, se verdadeiros, explicariam diversos aspectos da patogenia e terapêutica da toxoplasmose (Ambroise 2000).

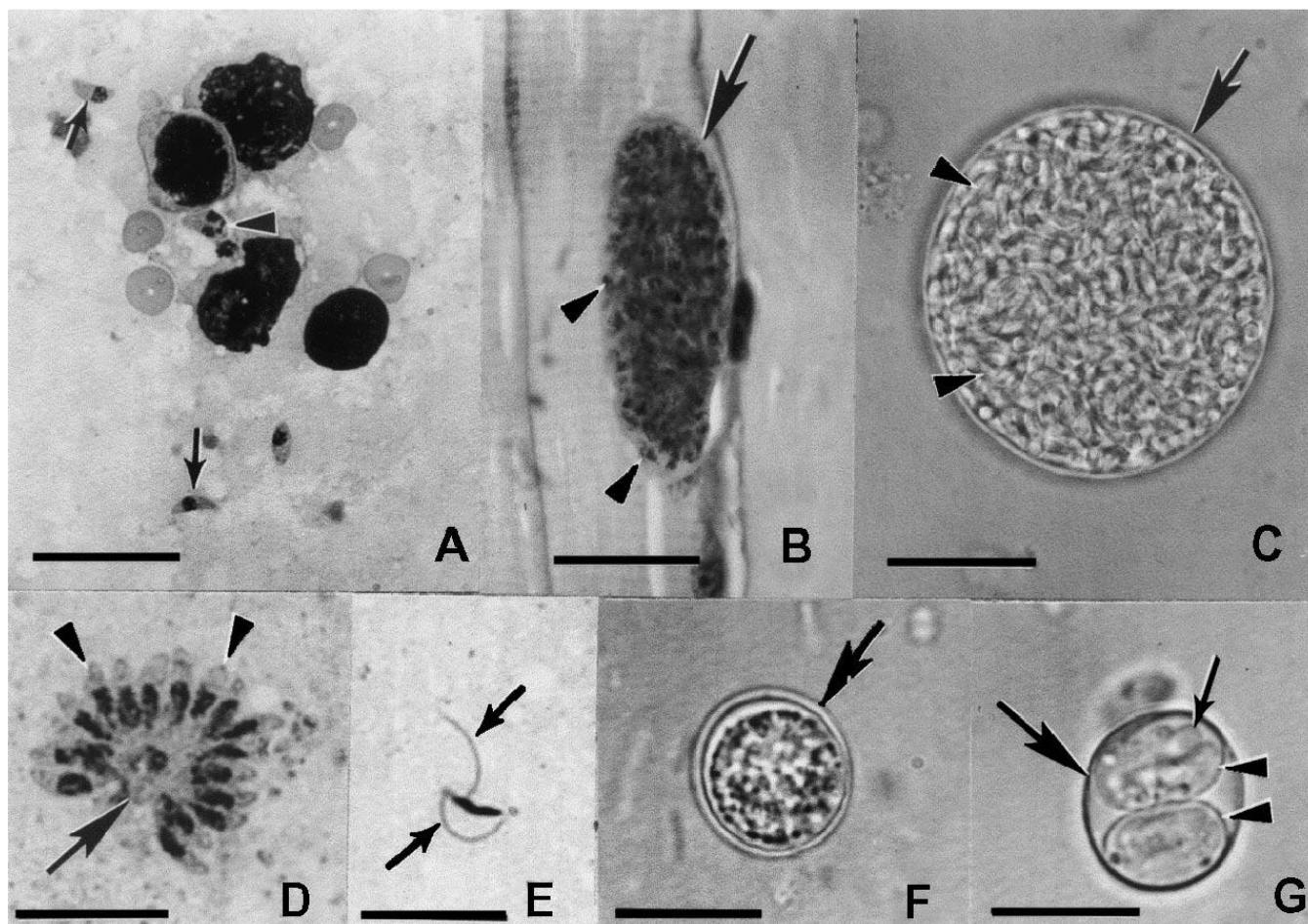


FIGURA: 3-(A) Taquizoítos em esfregaço de pulmão; (B) Corte de tecido muscular com cisto, que inclui muitos minúsculos bradizoítos em seu interior corado com hematoxilina e eosina; (C) Tecido de cérebro com centenas de bradizoítos; (D) Esquizontes com vários merozoítas em esfregaço de intestino de gatos infectados; (E) Gameta masculino com dois flagelos, corado em Giemsa; (F) Oocisto esporulado de fezes de gato; (G) Oocisto esporulado com uma fina parede e dois esporocistos, e cada esporocisto com quatro esporozoítos (Hill and Dubey 2002).

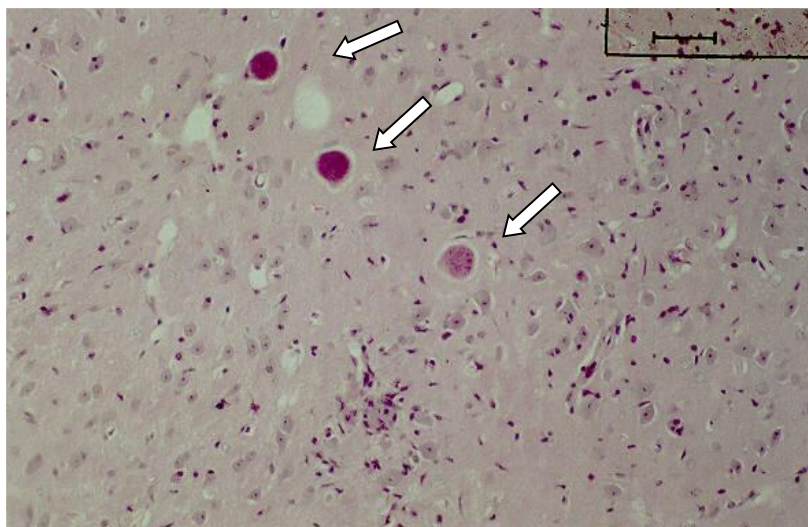


FIGURA: 4- Cistos de *T.gondii* (ME49), em tecido cerebral de camundongo. A barra representa 50µm Hematoxilina e Eosina.(Galisteo JR 2004)

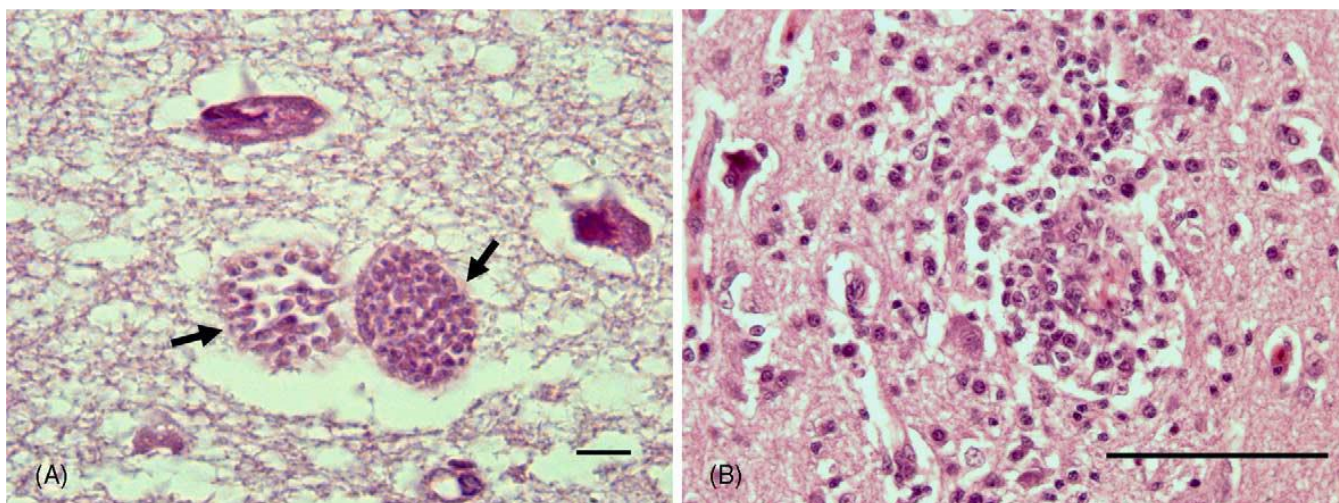


FIGURA:5- Cisto de *Toxoplasma gondii* 100 dias após inoculação.(A)10µm (B)perivascular 100µm corado em Hematoxilina e Eosina.( Martínez-Carrasco *et al.* 2005)

### 1.2.7. Cepas de *Toxoplasma gondii* e propostas de animais-modelo na pesquisa experimental

A análise genética populacional baseada no Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLPs) indica que *T. gondii* consiste em apenas três linhagens clonais, designada tipos I, II e III, que ocorrem tanto em animais como em seres humanos (Howe et al 1995).

A possibilidade de que o genótipo do parasito influencie a gravidade da doença em humanos, é suportada por diferenças na virulência, observada em modelos animais experimentais (Dubey et al 2003a). Essa diferença esta associada aos três diferentes linhagens, a do tipo I possui dose letal absoluta com um único parasito viável, sendo chamada de linhagem virulenta e esta relacionada a toxoplasmose humana congênita, enquanto que as linhagens do tipo II (estão ligadas a casos de reativação da infecção crônica) e a tipo III (estão associadas as infecções em animais) (Ferreira 2005) e ambas possuem uma dose letal de 50% em inóculos iguais ou maiores que mil parasitos, provocando facilmente infecção crônica e são consideradas avirulentas (Howe et al 1996). Existem muitas explicações possíveis para a estrutura populacional clonal do *T. gondii*, em primeiro lugar, o parasito pode ser transmitido entre hospedeiros intermediários, através do carnivorismo e necrofagia, não passando pelo ciclo sexual no hospedeiro definitivo (Howe & Sibley 1995; Su et al 2003). Em segundo lugar, muitos macrogametas não fertilizados permanecem viáveis no hospedeiro definitivo, podendo formar oocistos por partenogênese (Ferguson 2002). Em terceiro lugar, é provavelmente raro o encontro de felinos naturalmente infectados simultaneamente por duas diferentes linhagens de *T. gondii* (Boothroyd & Grigg 2002). A alta virulência da linhagem do tipo I foi primeiramente explicada, como sendo resultado das sucessivas passagens entre hospedeiros ou talvez resultado de condições ambientais. Este ponto de vista foi reforçado pelo isolamento precoce da cepa RH em 1939 por Sabin, esta cepa é característica do tipo I, sendo letal para camundongos mesmo em baixos inóculos. Um padrão semelhante também foi visto em um grande grupo independente de amostras analisadas por eletroforese de isoenzimas em multilocus (Darde´1992). A cepa tipo I quando injetados em camundongos alogênicos (SWISS) ou Isogênicos (BALB/c) e C57BL/6) a cepa RH leva-os a morte e por isso é considerada como uma cepa altamente virulenta, uma dose de  $10^5$  taquizoítos desta cepa seria suficiente para matar em 6-7 dias camundongos BALB/c (Ferreira GLS 2005). Em estudos que relacionaram à virulência aguda de cepas do tipo I de *T. gondii* com a capacidade destas

de gerar uma resposta imunológica com níveis extremamente altos de citocinas do grupo Th1, que provavelmente contribuiria com a lesão tecidual e até morte do indivíduo, enquanto que as cepas avirulentas dos tipos II e III gerariam também uma resposta do tipo Th1, mas com as citocinas em níveis adequados (Sibley 2003; Gavrilescu & Denkers 2001; Mordue et al 2001; Saeij et al 2005). Muitas destas informações, no entanto, foram obtidas de modelos experimentais em camundongos, não podendo ser diretamente transpostas para o modelo humano, e necessitando de estudos mais aprofundados (Filisetti & Candolfi, 2004).

Em contrapartida, tanto as cepas tipo II e III foram igualmente prevalente em uma amostra de 34 animais naturalmente infectados, sugerindo uma determinada associação do parasito com o genótipo tipo II com a doença clínica no homem (Howe & Sibley 1995). Neste grupo de cepas se destaca a cepa ME-49 que foi originalmente isolada da musculatura de carneiro sendo cistogênica e considerada avirulenta ou de baixa virulência, em camundongos BALB/c produz cistos que são, particularmente, evidentes no cérebro caracterizando a fase crônica da infecção. Por outro lado os camundongos C57/BL/6 infectados com a mesma cepa desenvolvem uma meningoencefalite progressiva com elevada taxa de mortalidade após 12 semanas de infecção (Ferreira 2005).

### **1.2.8. Modelos experimentais existentes e correlacionados com as cepas de *T.gondii***

Quando nos voltamos para modelos de infecção experimental com o *T.gondii* vários modelos animais, cepas e associações com drogas já foram sugeridos como podemos destacar em Handman et al que comparou as cepas C56 e C37 (virulentas) de *T.gondii* em camundongos Swiss Webster, Pereira et al 1999 utilizou um modelo com *Calomys callosus* e a cepa ME49 avaliando toxoplasmose adquirida e congênita com a indução de uveíte auto-imune, em Joag et al que inoculou em macacos o vírus SHIV, para avaliar patógenos oportunistas como o *T.gondii*, em animais como os hamsters por Gormley et al que compararam o aparecimento da toxoplasmose ocular e cerebral após inoculação intra-peritoneal e ingestão oral de cistos, em Braz et al que utilizou os camundongos BALB/c com uma previa infecção com cepa RH de toxoplasma avaliando a eficácia de drogas anti toxoplásmica, Guimarães et al 1997, compararam um grupo imunossuprimido com um grupo controle, inoculado com a cepa RH, concluindo que o grupo imunossuprimido teve uma evolução pior, antecipando a doença em 24 horas, em Lappin et al. 1997, estudaram o papel

da interleucina 6 (IL-6) em uveítes em felinos. Soro e aquoso foram coletados de gatos clinicamente normais e dos que foram inoculados com a cepa ME49 de *T. gondii*. A epidemiologia da toxoplasmose também foi descrita em outros modelos de animais como em lebres selvagens e em coelhos domésticos na Escandinávia e nos EUA (Dubey et al 1992), em coelhos selvagens na Alemanha (Mangold et al 1999) e República Tcheca (Literak e Rychlik, 1999). O coelho constitui-se em reservatório de *T. gondii*, cuja infecção é mantida graças à transmissão intra-uterina do protozoário (Hejlicek e Literak, 1995). Svoboda e Svobodova (1987) ressaltaram a importância da carne de fígado de coelhos infectados na transmissão da toxoplasmose para cães e gatos.

### 1.3. Patogênese da toxoplasmose

A partir de um crescimento nos casos de toxoplasmose, chegando a proporções de 60% de positividade em casos humanos e a alta prevalência também na população animal, levou a um maior interesse pela descoberta das fontes de infecção do parasito (Amato Neto et al 1995). Para a espécie humana existem varias fontes de contaminação, podemos encontrar cistos de toxoplasma em carnes mal cozida de porco, carneiro, bovina, aves, bem como oocistos no solo de domicilio e peridomicílio e em água, frutas e verduras mal lavadas. Existindo também a possibilidade de infecção via transplacentária. Mais raramente ocorre a transmissão por meio de transfusão sanguínea, transplante de órgãos e acidente em laboratório (Veronese 2002).

A contaminação pela água ainda está sendo estuda, porém recentes surtos de toxoplasmose relacionados com a contaminação da água por oocistos (Lindsay et al 2003). bem como numerosos trabalhos demonstrando a infecção em mamíferos marinhos como golfinhos, focas, lontras e baleias (Dubey et al 2003b) têm dado margem para a diversificação de idéias sobre as fontes de contaminação, como se teve durante muito tempo sobre a carne de diversos animais, principalmente de porcos que eram considerados como a maior fonte de infecção por *T. gondii* para o homem, devido aos cistos neles encontrados (Mcallister 2005).

As altas taxas de soroprevalência em grupos de vegetarianos restritos também podem ser explicadas pela contaminação tanto da água quanto dos alimentos, até mesmo vegetais, com oocistos de *T. gondii* (Hall et al 1999). Sua alta prevalência em inúmeras regiões no mundo com importância médica e veterinária (Remington et al 1995) distribui-se em uma proporção de 70% a 100% de adultos, estimando-se que meio bilhões de indivíduos possuam

anticorpos contra o *T. gondii* (Sharma 1990); na Espanha, a taxa de prevalência observada de anticorpos IgG em gestantes foi de 38,8%, sendo que em 1,2% foi detectada a imunoglobulina IgM (Jaqueti et al 1991); nos Estados Unidos a prevalência de IgG foi cerca de 40% (Server et al 1988); na Suécia, (Jacquier et al 1995) encontraram uma soroprevalência para IgG de 46,1% e de IgM 1,7%; na Finlândia foi 20,3% (Lapplainem et al 1995); e na França, a soroprevalência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* foi de 87,7% (Rodier et al 1995). No Brasil cerca de 70% da população já foi infectada em um momento da vida (Vergara et al 1985), apresentando prevalências de 56,2% na região norte, 73,9% na Amazônia Brasileira, no Nordeste 74,7 (PE), 51,6% no Centro-Oeste(em Mato Grosso nos índios do Xingu), no Suldeste 78,7% no RJ, 50,3 em MG e na grande São Paulo aproximadamente 69%(Araujo 1970, Azevedo et al 1983, Coutinho et al 1981, Jamra & Guimarães 1981, Ferrarone & Lacaz, 1982, Amato-Neto et al 1984, Guimarães et al 1993) Na população infantil a soroprevalência é relativamente baixa, aumentando de acordo com a idade, com a exposição a mais fatores de risco durante o transcorrer da vida (Amendoeira et al 1999, Cantos et al 2000, Tenter et al 2000).No Brasil destacam-se cidades como Jaguapitã no Paraná, Erechin, e Campos de Goytacazes no Rio de Janeiro, na primeira apresentou 82,9% dos indivíduos examinados positividade contra o *T.gondii*, e destes, 26,8% tiveram algum tipo de lesão ocular (Garcia et al 1999), em Erechin, 17,7% das pessoas examinadas apresentaram lesões oculares, sendo que a maioria dos casos foi detectada em indivíduos adultos, mostrando que a toxoplasmose ocular pode ser considerada uma seqüela da infecção aguda adquirida (Glasner et al 1992) e na cidade Campos de Goytacazes, a prevalência de toxoplasmose ocular na área rural foi de 14% e na área urbana 8% (Petersen et al 2001).

### **1.3.1. Alterações patogênicas na toxoplasmose**

O *T. gondii*, pode causar infecção endógena latente. Quando ocorre supressão suficiente e severa da resposta imune, este provoca uma forma severa da doença, que na maioria dos indivíduos ocorre da forma sistêmica e fatal, especialmente se não houver nenhum diagnóstico adiantado e nenhuma terapia específica adequada (Ferreira 2000).

O tamanho do inóculo, a virulência da cepa, a via de infecção e a espécie hospedeira parecem afetar diretamente o rumo da infecção toxoplásmica em seres humanos e demais

animais (Montoya & Liesenfield 2004). Os processos patológicos e os sinais clínicos da toxoplasmose podem ser separados conforme o status do hospedeiro:

### 1.3.2. Toxoplasmose em Imunocompetentes

Cerca de 90% dos casos de infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes (incluindo crianças e mulheres grávidas) são assintomáticos, em 10% dos casos surgindo sintomas pouco específicos que raramente necessitam de tratamento (Montoya & Liesenfield 2004). Apesar de infectar com frequência o homem, geralmente causa perturbações leves e temporárias (Remington et al 1995), podendo causar em alguns casos doença ocular (Roberts & McLeod 1999)

Os adultos infectados que apresentam a doença na fase aguda, manifestam uma sintomatologia sob as formas clínicas: linfoglandular, pneumonite, hepatite (sendo discreta e de curta duração, a cicatrização não acarreta seqüelas) (Vischer et al 1967), miosite, meningoencefalite, erupção cutânea e coriorretinite. A forma linfoglandular é a mais comum daquelas adquiridas da toxoplasmose aguda e em poucas semanas ocorre o desaparecimento dos sintomas, porém, algumas manifestações clínicas, além de serem mais raras de acontecer, caracterizam um quadro mais grave da toxoplasmose aguda adquirida e os órgãos mais afetados são os linfonodos, o encéfalo, o coração, o fígado, a musculatura esquelética e, raramente, afetando os pulmões (Frenkel 1988; Beaman 1995; Amato Neto, 1995; Cimerman & Cimerman 1999, Figueiró-Filho et al 2005). Nesta fase aguda sintomática da toxoplasmose apresenta diversos indícios clínicos sobre sua evolução desempenhados pela resposta imunológica ao *T. gondii* iniciando-se logo após a infecção, pois o parasito é capaz de desencadear a ativação não-específica de macrófagos (Filisetti & Candolfi 2004), que juntamente com as células NK formam a primeira linha de defesa contra o *T. gondii* (Gazzinelli et al 1993; Sher & Sousa 1998). Os macrófagos possuem papel crucial na resposta imune, pois, são estimulados pelos taquizoítos a produzirem as células NK e células T, que produzem interferon- $\gamma$  (INF), sendo este crucial para a resistência a infecção (Bhopale 2003). A ação sinérgica do INF com o fator de necrose tumoral (TNF) media a destruição dos taquizoítos pelos macrófagos). Os mecanismos de destruição incluem mecanismos oxidativos e não oxidativos (com destaque para a ação do óxido nítrico), produtos do metabolismo do ácido araquidônico (Roberts & McLeod 1999) e degradação do triptofano intracelular pela indolamina 2, 3-dioxigenase (Pfefferkorn et al 1986). A defesa não específica tem um

mecanismo que chega a seu pico na primeira semana de infecção, declinando vagarosamente até desaparecer por volta da segunda semana (Filisetti & Candolfi 2004). A resposta imunológica não específica leva a diferenciação de macrófagos e células B em células apresentadoras de antígenos, estimulando a ação de células efectoras (Filisetti & Candolfi 2004), estas exercem sua função via atividade citotóxica e/ou secretando citocinas envolvidas na regulação da resposta imune (Hunter et al 1994). Enquanto as citocinas produzidas pela sub-população Th1 estão associadas a ação protetora contra a infecção, as citocinas produzidas pela sub-população Th2 estão relacionadas a baixa regulação da resposta imune e promoção da multiplicação dos parasitas (Roberts & McLeod 1999; Denkers et al 2004). No entanto, as infecções humanas por *T.gondii* geralmente evoluem para a cronicidade, e os cistos tissulares tornam as formas parasitárias despercebidas para o sistema imunitário do hospedeiro (Denney et al 1999). Nesse caso, o sucesso do parasitismo crônico está relacionado ao controle parasitário da resposta inflamatória, o que determina a permanência silenciosa do parasito no organismo hospedeiro (Denney et al 1999)

### **1.3.3. Toxoplasmose em imunocomprometidos**

A toxoplasmose em um hospedeiro imunocompetente provoca infecção usualmente assintomática; porém em pacientes imunodeprimidos por transplante de órgãos ou em tratamento por quimioterapia e ou com a imunodeficiência humana (HIV) se não tratados, podem desenvolver graves lesões cerebrais, coriorretinite, pneumonite e miocardite (Figueiró-Filho et al 2005; Lescano et al 2004) podendo vir a ser fatal, e tendo como destaque a encefalite toxoplásmica como a manifestação mais comum como resultante da reativação de uma infecção crônica (Lescano et al 2004.) e estimando-se que 30 a 40% dos doentes imunossuprimidos com AIDS desenvolvam tal quadro (Hunter, 1994), sendo responsável por 25%-80% das infecções do SNC na AIDS (Ravel 1998) sendo na Europa, a prevalência aumenta de Norte para o Sul oscilando entre os 12% da Noruega e os 80% de algumas regiões da Europa Ocidental (Hunter et al 1994). Em casos de imunossupressão por transplante, no primeiro mês pós-transplante prevalece às infecções hospitalares, com a etiologia dependendo da flora hospitalar de cada Instituição. Nesse período ocorrem com certa frequência algumas infecções oportunistas menos graves como as reativações de herpes simples e a candidíase mucocutânea, além da possibilidade de aparecimento de doenças presentes no momento do transplante, como por exemplo, estrogiloidíase, que às vezes

apresenta quadro disseminado grave. Entre o 2º e o 6º mês pós-transplante prevalecem as principais infecções oportunistas, como as infecções por citomegalovírus, toxoplasmose, reativação de doença de Chagas, aspergilose, pneumonia por *P.carinii* e outros. (Almeida et al 1999).

#### 1.3.4. Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico clínico não é fácil de ser realizado, pois os casos agudos podem levar à morte ou evoluir para a forma crônica. Esta pode manifestar-se assintomaticamente ou, então, se assemelhar a outra doença (mononucleose). Os principais tipos da toxoplasmose adquirida são: assintomática, aguda, linfoganglionar e crônica. Os casos agudos fulminantes são raros e se caracterizam pela febre, erupção eritematosa da pele e sinais de acometimento do coração e sistema nervoso central (Cimerman & Cimerman 1999).

Alem de manifestações generalizadas a Toxoplasmose pode causar lesões focalizadas na região ocular, causando a maior parte dos casos sendo a coriorretinite a lesão mais freqüentemente associada à toxoplasmose, e, em 30 a 60% dos pacientes com esta enfermidade, pode-se atribuir à etiologia ao toxoplasma. Dois tipos de lesões de retina podem ser observados a retinite aguda, com intensa inflamação e a retinite crônica com perda progressiva de visão, algumas vezes chegando à cegueira. Durante muito tempo a toxoplasmose ocular foi considerada oriunda da reativação de casos crônicos, entretanto estudos recentes têm demonstrado que as lesões oculares podem surgir também como resultado de primoinfecção em indivíduos saudáveis (Couvreur & Thulliez 1996). Acreditando-se que a corrente sanguínea é a via de infecção. Os capilares levam os taquizoítos livres ou dentro de leucócitos até a região da retina, onde estes começaram a invadir as células adjacentes ao vaso, rompendo-as em seguida ocasionando destruição tecidual (Roberts & McLeod 1999). A retinocoroidite é a lesão mais freqüente, consistindo em uma lesão focal granulomatosa e necrosante. Outras alterações causadas pelo *Toxoplasma gondii* só deveriam afetar pessoas imunocomprometidos, porem podemos ver casos não comuns de lesões em imunocompetentes que deveriam se desenvolver habitualmente benigna, como em relato de caso de uma paciente que apresentou desmaios e diminuição da acuidade visual, crises convulsivas parciais, perda progressiva da capacidade de desempenhar suas tarefas habituais, abscessos cerebrais por *Toxoplasma gondii* (Silva et al 2001).

De um modo geral, o diagnóstico clínico deve ser confirmado por reações sorológicas conclusivas e, se possível, pela demonstração e isolamento do parasito (Park *et al* 1993) como observado em um quadro da toxoplasmose congênita ou neonatal, com sua síndrome sintomática, é mais característico, porém, não basta para firmar o diagnóstico, que dependerá também da confirmação laboratorial (Veronesi 2002).

O diagnóstico laboratorial para a toxoplasmose pode ser realizado por métodos indiretos, através de métodos sorológicos, e diretamente, por reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridação, isolamento e anatomopatologia (Montoya & Liesenfeld 2004).

O primeiro teste disponível para detectar anticorpos específicos anti-*T. gondii* foi a reação de Sabin-Feldman (*dye test*). Cinqüenta anos depois da sua descrição, ainda é considerado um teste de referência com taxas altas de sensibilidade e especificidade (Sabin & Feldman 1948). Porém, a sua utilização tem sido restrita pelo uso obrigatório de toxoplasma vivo, o que traz graves problemas de biossegurança (Reiter-Owona *et al* 1999).

Diferentes técnicas têm a propriedade de detectar esses anticorpos no sangue dos pacientes. Testes como imunofluorescência, hemoaglutinação, *immunosorbent agglutination assay* (ISAGA), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ou *microparticle enzyme immunoassay* (MEIA) têm papel principal no cenário do diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* (Ashburn *et al* 1998; Cantos *et al* 2000; Hill & dubey 2002; Montoya & Liesenfeld 2004; Skinner *et al* 1989).

Na fase aguda da toxoplasmose, ocorre primeira instancia a produção de imunoglobulina M (IgM), seguida da produção de imunoglobulina G ( IgG), a infecção pode também produzir imunoglobulina A (IgA), no caso da transmissão ter sido por via oral mediada pela ingestão de oocistos maduros (Carvalho *et al*1999, Decoster A 1995).Pela técnica de imunofluorescência, os anticorpos IgM podem ser dosados 1 a 2 semanas depois do início da infecção, alcançando um pico em 6 a 8 semanas, quando então declina, e podendo permanecer títulos baixos por mais de 12 meses, sendo considerados assim um IgM residual(Cantos 2000). O anticorpo IgG se encontra também presente desde o início da parasitose, porém não desaparece totalmente persistindo por toda a vida na maioria dos pacientes, embora possam ser mais baixos (Goldsmith 1998).

Porem evidentes limitações desses métodos tem se observado, uma vez que são descritas falhas ao detectar IgG e IgM durante a fase ativa da infecção, e tem sido demonstrado que esses anticorpos podem não ser produzidos durante as primeiras semanas

da parasitemia (Mei-Hui et al 2000), a partir disso casos como a toxoplasmose congênita pode não ser detectada.

Mais recentemente evidenciou-se que a avidéz da IgG pelo antígeno de *T. gondii* (que mede a capacidade de ligação entre esse anticorpo e seu antígeno) medida pela afinidade funcional aumenta com o passar do tempo ( Leser et al 2000), isso, segundo a opinião de vários autores, é um marcador informativo à medida que a baixa avidéz da IgG poderia ser interpretada como indicador do diagnóstico de infecção toxoplásmica recente, em combinação com um painel de outros exames (Montoya & Liesenfeld 2004). Entretanto ainda é evidente uma extensa janela de valores indeterminados (Rossi 1998). De igual forma, o diagnóstico sorológico da toxoplasmose é complicado em pacientes imunocomprometidos, fetos, recém-nascidos, receptores de órgãos transplantados e principalmente, em pacientes com AIDS. Nestes casos e nas gestantes com diagnóstico sorológico presuntivo de fase aguda, a detecção direta do parasito pode ser proposta (Johnson et al 1993; Joss et al 1993).

#### **1.4. Aspectos terapêuticos da toxoplasmose**

##### **1.4.1. Terapias imunossupressoras**

Em regimes imunossupressores como os utilizados em transplantes de órgãos usam-se, por exemplo, drogas como a tacrolimus, microemulsão ciclosporina, azatioprina, sirolimus, corticoides entre outras (Meier-Kriesche et al 2006) que geralmente podem ser caracterizados como tratamento para a indução, manutenção ou terapia do salvamento. Na indução da imunossupressão uma terapia profilática é intensamente usada, para impedir a rejeição aguda (Kirk 2006). Contudo essas terapias podem causar efeitos colaterais como observado, por exemplo, em transplantes renais onde protocolos com azatioprina, Mofetil micofenolato, ciclosporina e Tacrolimos, podem desencadear alterações hematológicas (depressão medular), hepatite e colestase (elevação das transaminases e bilirrubina(azatioprina), alterações gastrintestinais (diarréia, náusea e vômitos), alterações hematológicas (depressão medular), aumento de incidência de doenças linfoproliferativas e infecções oportunistas (Mofetil micofenolato). Ressaltando como efeito mais grave desta classe de medicamentos sua nefrotoxicidade, que pode apresentar-se de forma aguda e/ou crônica (ciclosporina e tacrolimos)(Burdmann et al 2004).Em outras terapias

imunossupressoras em pacientes submetidos a outros tipos de transplante destacamos associações como a ciclosporina neoral, azatioprina, prednisona ou a combinação de duas como azatioprina e a prednisona, Mofetil micofenolato, ciclosporina e prednisona, entre outras associações que terão suas variações conforme estado, idade situação do paciente e do doador.(lanhez 2001)

#### **1.4.2. Corticóides**

Os corticóides são hormônios de natureza esteroídica produzidos na porção cortical das glândulas adrenais e constituem três famílias: os glicocorticóides, os mineralocorticóides e os andrógenos adrenais (Zoorob et al 1998). O principal glicocorticóide é o cortisol (ou hidrocortisona), cuja taxa de secreção no homem é de 10 a 20 mg nas 24 horas (Zoorob et al 1998, Mcevoy et al 1996). Sua concentração média no plasma é de 14 mg/dl, entretanto, seus níveis variam amplamente durante o período de 24 horas, atingindo valores mais elevados nas primeiras horas da manhã (15 a 25 mg/dl) e diminuindo gradualmente para 2 a 5 mg/dl no final do dia (Zoorob et al 1998, Mcevoy et al 1996).O excesso dos glicocorticóides (exógeno ou endógeno) suprime a resposta imunológica normal, sendo esta propriedade imunossupressora a que melhor caracteriza as suas indicações terapêuticas para o tratamento dos processos inflamatórios, doenças auto-imunes e para a viabilização de transplantes (Mcevoy et al 1996, Kountz et al 1997) podendo também causar alterações cosméticas, distúrbios do crescimento, alterações ósseas (necrose assética), alterações de cicatrização, alterações do metabolismo glicídico, catarata e alterações psiquiátricas (Burdmann et al 2004), distúrbios dermatológicos acne, hirsurtismo, equimoses(Kountz et al 1997)O efeito antiinflamatório e imunossupressor dos glicocorticóides ocorre devido às suas seguintes ações Interferem na circulação das células imunes, diminuem o número de linfócitos periféricos, principalmente linfócitos T e inibem o acúmulo de neutrófilos no local da inflamação, promovem apoptose das células linfóides, inibem a síntese de citocinas, modulam direta e indiretamente a função das células B, inibem a resposta proliferativa dos monócitos ao fator de estimulação de colônias e sua diferenciação em macrófagos, também inibindo as suas funções fagocíticas e citotóxicas, inibem o movimento de células e fluídos a partir do compartimento intravascular, e inibem a ação da histamina, a síntese das prostaglandinas (Zoorob et al 1998, Kountz et al 1997). A dose de corticóide varia individualmente. Uma dose baixa ou de manutenção varia de 0,1 a 0,25 mg/kg/dia de prednisona; uma dose moderada, com efeito antiinflamatório, seria de 0,5

mg/kg/dia de prednisona e uma dose alta, potencialmente imunossupressora, varia de 1 a 3 mg/kg/dia de prednisona (Kountz et al 1997). Esses efeitos, antiinflamatórios ou imunossupressores, sofrem variação, também, de acordo com o tempo de uso, sendo que uma dose baixa usada por tempo prolongado é capaz de causar imunossupressão do paciente (Kountz et al 1997) Formas disponível: dexametasona, betametasona e prednisolona; os corticóides mais fracos, como a fluormetolona têm valor limitado (Finamor et al 2002).

### **1.4.3. Terapia Anti-toxoplásmica específica (quimioterápicos)**

O tratamento da toxoplasmose é realizado de forma padrão, pela combinação sinérgica de pirimetamina e sulfonamidas embora já existam alguns outros medicamentos com reconhecida atividade antitoxoplasma como a clindamicina, o sulfametazol-trimetoprim e a espiramicina. Contudo nenhum destes tem a mesma eficácia da combinação antes citada, vale citar que não possuem ação contra os cistos do parasito, podendo ser prescritos em situações específicas e, portanto imperioso tentar encontrar mais recursos terapêuticos, principalmente em virtude da AIDS, afigurando-se ainda melhor se houver efetividade na forma cística (Braz et al 1999). No entanto, devido a sua toxicidade, a eficácia terapêutica desta combinação pode ser seriamente limitada nos casos de imunodeprimidos, pois estes fármacos causam distúrbios colaterais expressivos (Lescano et al 2004). Em algumas lesões características da toxoplasmose como vitreíte, iridociclite, vasculite ou até mesmo retinocoroidite focal (hoje em dia já não podemos afirmar que a toxoplasmose ocular sempre causa esta lesão) estão sendo utilizadas associações com novas drogas promissoras como a Rifabutin, a Claritromicina, o Atovaquone e a Azitromicina, que apresentam menor toxicidade do que a Sulfadiazina e a Pirimetamina, que permanecem como as drogas de primeira escolha (Silveira 2001)

## **2. OBJETIVOS DO TRABALHO**

### **2.1. Objetivos gerais**

Avaliar o potencial de reativação ou não da toxoplasmose crônica em modelo murino, sobre a ação de medicamentos imunossupressores.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar clínica e laboratorialmente (sorologia e histopatologia) o comportamento da toxoplasmose murino utilizando a linhagem BALB/C e a cepa ME49 (cistogénica) de *Toxoplasma gondii* após terapia imunossupressiva (Dexametasona, Azatioprina, acetato de cortisona associadas ou não).
- Avaliar o potencial risco da reativação da toxoplasmose nesse modelo murino proposto.

### **3 . MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos gerais**

#### **3.2. Área e local do estudo**

Todo as partes da pesquisa foram realizadas e desenvolvidas no Instituto de Patologia Tropical e Saúde pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás, localizado na cidade de Goiânia estado de Goiás. Com fornecimento e armazenamento dos camundongos BALB/c em ambiente próprio para esse estudo

(Godard 2001) Esses animais foram mantidos em gaiolas de plástico com palha de arroz autoclavada, recebendo ração comercial e água autoclavada e acidificada *ad libitum*. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as normas de cuidados de animais de laboratório (Clark, 1996) e com os “Princípios de Ética em Experimentação Animal” (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal- COBEA).

#### **3.3. Modelo utilizado**

Os camundongos utilizados neste trabalho foram os camundongos BALB/C, observados diariamente por um período de 60 dias após infecção com 20 cistos da cepa ME49 e tratados com drogas imunossupressora por um período de 28 dias por via oral (gavagem) tomando-se especial atenção para o surgimento de sintomas típicos de reativação da toxoplasmose crônica (diarréia, cegueira, letargia e pêlos arrepiados) ou por casos de morte durante este.

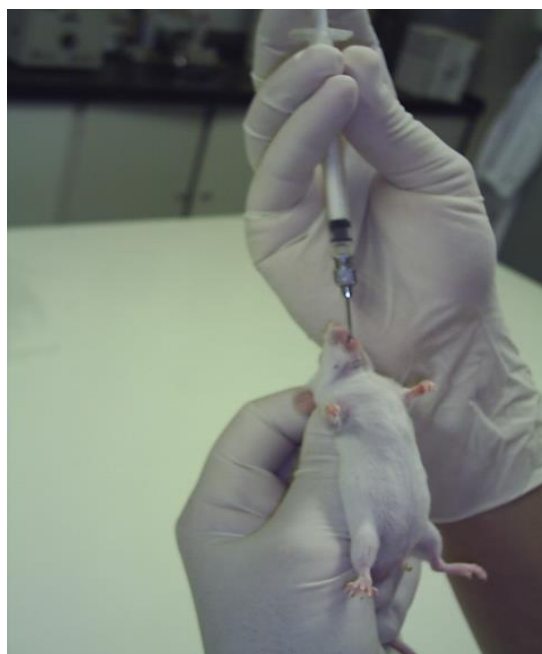


FIGURA 6. Procedimento de administração de material por via oral(gavagem) em camundongo BALB/c.

### 3.3.1. Agente infeccioso

Foi selecionada para o estudo a cepa ME 49 de *Toxoplasma gondii* pertencente ao tipo II, por induzir uma infecção crônica em camundongos BALB/c (Sibley & Howe 1996). A cepa foi mantida rotineiramente por sucessivas passagens com um intervalo de 60 a 90 dias por inoculação via oral, com suspensão de 20 cistos obtidos pelo macerado do cérebro do camundongo previamente infectado e reinoculados em camundongos BALB/c no biotério do IPTSP.

### 3.3.2. Modelo animal experimental e casuística

Os camundongos utilizados foram da linhagem BALB-c do sexo masculino pesando aproximadamente 20g e 40 dias de vida. Foram mantidos no biotério do IPTSP-UFG onde receberam ração comercial e água *ad libitum* e gaiola com palha de arroz autoclavada.

Tendo sido utilizado 87 camundongos BALB/c nestes parâmetros, sendo utilizados 20 para estudo piloto, 35 para controles e 32 para o experimento principal(camundongos infectados recebendo drogas imunossupressoras).Os camundongos que receberam as drogas imunossupressoras( infectados ou não) foram observados e tratados por 28 dias, e foram sacrificados em câmara de éter etílico, necropsiados, e tiveram seus órgãos retirados (fígado,

baço, pulmão, coração e cérebro) para estudos histopatológicos, o sangue foi retirado por punção cardíaca para estudo sorológico através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

### **3.3.3 Casuística e critérios de amostragem**

Foi estabelecido como critério estatístico da amostragem uma média ponderada, e caracterizando como critério de inclusão no perfil de reativação os casos de morte ou manifestações clínicas característica, durante os procedimentos de tratamento ou observação durante o período de infecção, e como critério de exclusão para reativação os camundongos sobreviventes sem manifestação clínica.

### **3.3.4. Procedimentos utilizados**

Foi realizado um estudo piloto, na forma de curva de virulência, para determinar o maior inóculo de cistos capaz de estabelecer a infecção crônica sem provocar a morte do camundongo, conforme previamente sugerido por Sumyuen et al 1996.

Foram utilizados 20 camundongos divididos em grupos de 5 animais cada, que receberam 7, 15, 20 e 30 cistos por via oral (gavagem). Os animais foram observados diariamente por um período de oito semanas, quando a infecção crônica é considerada estabelecida (Djurkovic-Djakovic & Milenkovic 2001) para o surgimento de sintomas clínicos de toxoplasmose aguda ou eventual morte do animal. Foi considerado ideal o maior número de cistos que induziu à infecção crônica com mortalidade nula. Após o término do estudo piloto, os camundongos sobreviventes foram sacrificados, seus cérebros retirados e feita a contagem de cistos conforme metodologia citada.

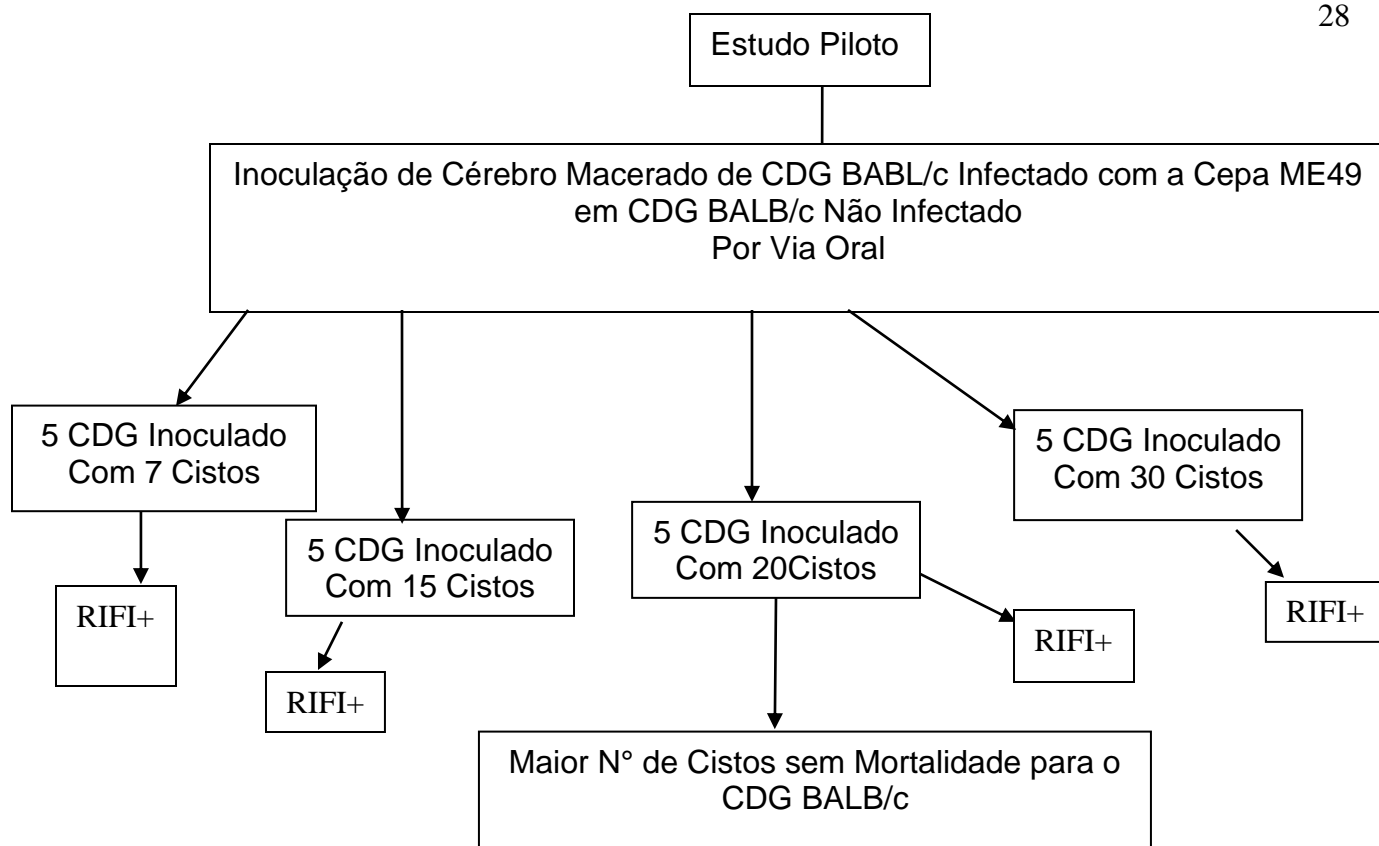


FIGURA 7: Organograma dos procedimentos adotados para o estabelecimento da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* em camundongos BALB/c

A partir dos resultados obtidos no estudo piloto foi estabelecido o inóculo de 20 cistos como o número ideal para o modelo murino proposto. Desta forma passou-se a inocular com esta quantidade nos camundongos que foram em seguida submetidos à terapia imunossupressora no seguinte modelo:

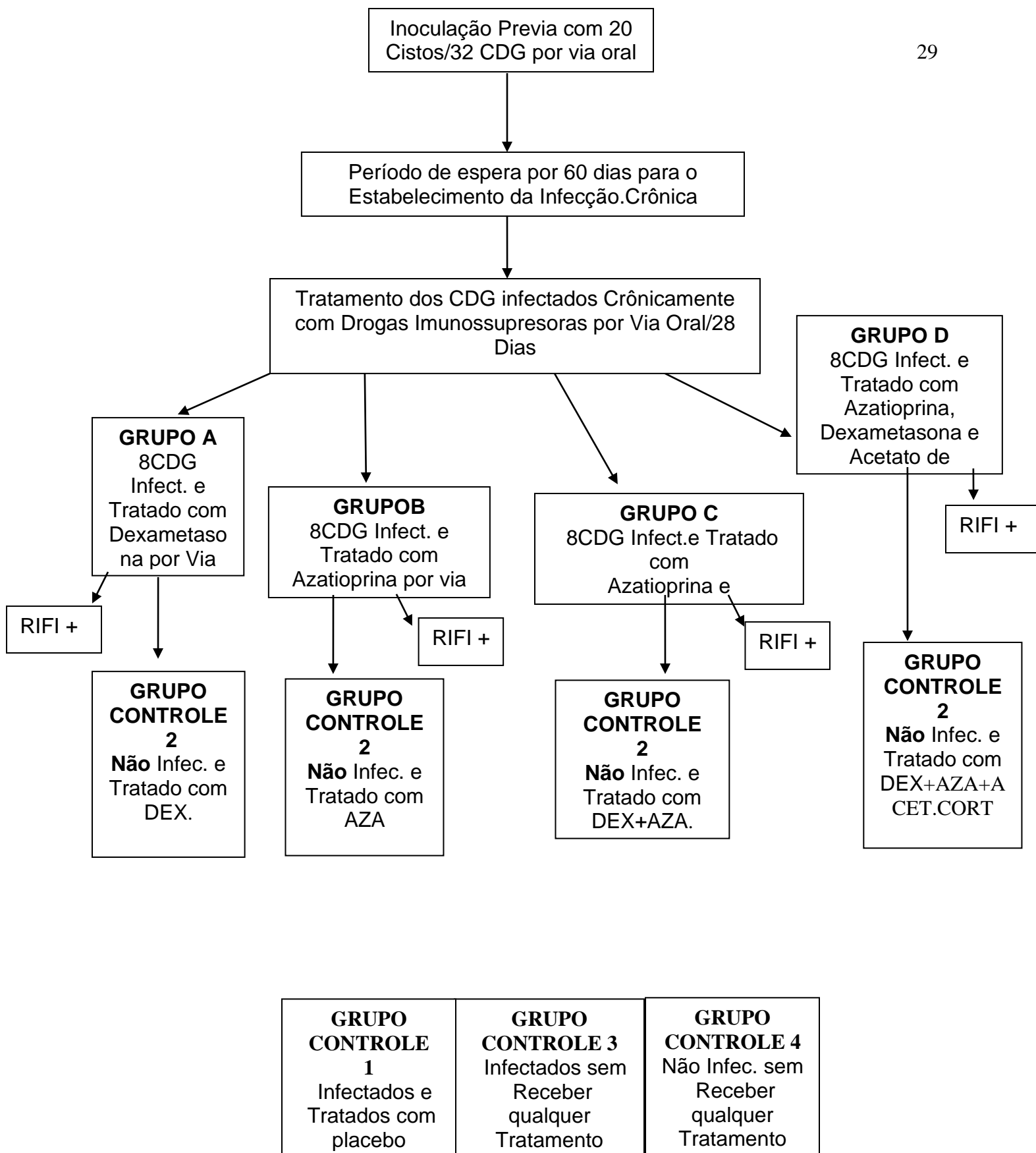


FIGURA 8: Organograma dos procedimentos realizados com drogas imunossupressoras e seus respectivos controles

As drogas imunossupressoras usadas no modelo terapico proposto por 28 dias, juntas e/ou separadas se deram nas seguintes condições:

-2.5mg/kg três vezes por semana de Dexametasona administrada, preparada pela diluição de 5mg de dexametasona, tendo sido diluída com 4mL de água destilada, e administrado por via oral o volume de 0,1mL (Djurkovic-Djakovic & Milenkovic, 2001);

-10 mg/kg cinco vezes por semana de Azatioprina administrada por via oral, e preparada pela diluição de 50 mg de azatioprina em 12,5 mL de água destilada, e administrado por via oral 0,05mL(Sumyuen et al 1996);

-50mg/Kg duas vezes por semana de Acetato de cortisona em injeção subcutânea, preparado pela diluição de 50mg de acetato de cortisona em 3,30ml de diluente, e administrado por via subcutânea 0,1mL;

Para prevenir uma possível superinfecção bacteriana, foi adicionada Amoxicilina (1g/L) na água oferecida aos animais, somente durante o tratamento.

### 3.3.5. Divisão por Grupos que receberam as drogas imunossuprimidos

#### **Grupo A**

Foi administrada por via oral a terapia imunossupressora com Dexametasona em dosagem de 2.5mg/kg por dia por camundongo, três vezes por semana em dias alternados;

#### **Grupo B**

Foi administrada por via oral a terapia imunossupressora com Azatioprina em dosagem de 10mg/kg cinco vezes por semana em dias seguidos;

#### **Grupo C**

Foram administradas por via oral as terapias imunossupressoras associadas:

Azatioprina+Dexametasona em dosagens de 2.5mg/kg de Dexametasona e 10mg/kg de Azatioprina;

#### **Grupo D**

Foram administradas por via oral as terapias imunossupressoras associadas:

Azatioprina+Dexametasona+Acetato de cortisona em dosagens de 2.5mg/kg três vezes por semana em dias alternados, por via oral de Dexametasona, 10mg/kg cinco vezes por semana em dias seguidos por via oral de Azatioprina e 50mg de Acetato de cortisona duas vezes por semana em injeção subcutânea de Acetato de cortisona

Concomitantes aos grupos citados acima, para cada terapia proposta, foram mantidos grupos com cinco camundongos controles, divididos em:

#### **Controle 1**

Animais infectados cronicamente (dois meses de infecção) com a cepa ME49, recebendo soro fisiológico nas mesmas formas de administração preconizadas;

#### **Controle 2**

Este grupo foi formado por animais não infectados e submetidos à terapia imunossupressora, sendo dividido em quatro subgrupos: o primeiro recebeu 2.5mg/kg de Dexametasona, três vezes por semana em dias alternados por via oral; o segundo recebeu 10mg/kg de

Azatioprina por dia cinco vezes por semana em dias seguidos por via oral; o terceiro grupo recebeu 50mg/Kg de Acetato de cortisona duas vezes por semana em injeção subcutânea; o quarto grupo recebeu a associação destas drogas seguindo o mesmo padrão de administração.

### **Controle 3**

Animais infectados cronicamente com a cepa ME49 sem receber qualquer tratamento de droga ou placebo;

### **Controle 4**

Animais não infectados sem receber qualquer tratamento de droga ou placebo, porém mantidos no mesmo ambiente que os demais;

Todos os animais foram observados diariamente, para o surgimento de sintomas de toxoplasmose aguda.

#### **3.3.6. Manutenção da cepa**

A fim de obter um número de cistos suficientes para a realização do estudo, foi feito um grupo de seis camundongos infectado com a cepa ME49. Para tanto se utilizou a metodologia estabelecida por Grujić et al 2005, assim o cérebro do camundongo infectado, foi macerado, homogeneizado, adicionado a 10 mL de salina e posteriormente inoculado em 10 camundongos BALB/c .

Cinco dias após a inoculação, os animais apresentaram quadro clínico de toxoplasmose, que equivale a fase aguda da doença (Montoya & Liesenfield 2004) sendo os sintomas mais comuns a anorexia, perda de peso, cegueira, pêlos arrepiados e taquicardia (Da Silva 2003). Foi feito o sacrifício com éter destes camundongos, e foram visualizadas formas taquizoíticas do parasito em liquido peritoneal, sendo estas utilizadas na reinoculação por via intraperitoneal em novos animais. Estes últimos não apresentaram sintomas clínicos de fase aguda, estabelecendo-se a infecção em sua forma crônica. Após oito semanas estes animais passaram pelo mesmo procedimento acima citado, e o macerado do cérebro foi observado ao microscópio de luz, encontrando-se diversas formas císticas de *Toxoplasma*

*gondii*. Desde então a cepa é mantida por meio de periódicas passagens em camundongos por gavagem.

### 3.3.7. Contagem dos cistos

A contagem dos cistos foi realizada conforme o estabelecido por Grujić et al 2005, onde o cérebro de um camundongo previamente infectado foi macerado, homogeneizado em 1mL de solução salina, sendo retirados 100µl da suspensão e estes divididos em quatro lâminas com 25µl cada, colocado entre lamínula, e observada ao microscópio de luz, sob objetiva de 40X, para a determinação do número de cistos. A quantidade de cistos por cérebro foi calculada multiplicando-se por 10 o número obtido.

### 3.4. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

#### 3.4.1. Punção intra-cardíaca

Foram coletadas amostras de sangue por meio de punção intra-cardíaca (Bovo et al 2005), o sangue retirado foi centrifugado a 3.000 RPM/10 minutos, o soro obtido foi transferido para tubos de polipropileno devidamente identificados e guardados a -20°C até o momento de serem utilizados.(Figura:2)

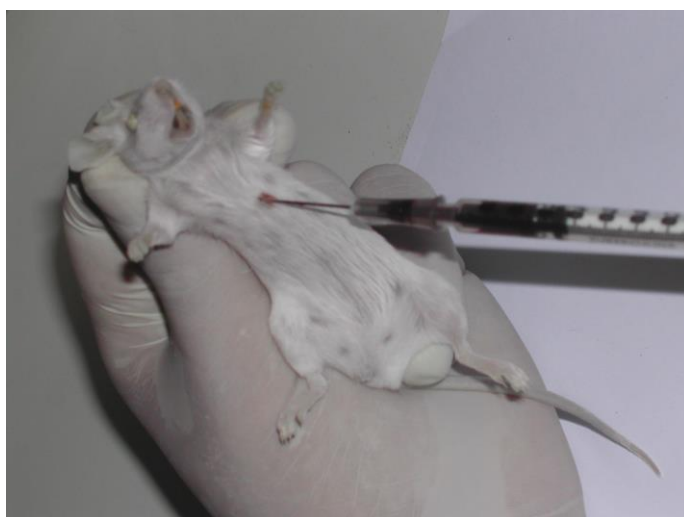


FIGURA 9. Punção cardíaca em camundongo BALB/c.

### 3.4.2. Realização da RIFI

A RIFI foi realizada conforme o preconizado por Camargo 2001, onde, os soros dos camundongos foram descongelados até alcançar a temperatura ambiente e em seguida foram diluídos em salina tamponada (PBS).

Após diluição, foi acomodado 5µl do soro em cada poço de lâminas sensibilizadas com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (Bioshop®) que foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas em estufa por 30 minutos à 35°C. Após este período as lâminas foram lavadas em PBS por duas vezes (cinco minutos cada), secas e adicionou-se o conjugado previamente diluído.

Foram utilizados conjugados IgG e IgM fluorescente de cabra anti-camundongo (conjugado anti-cadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA®) diluídos cada um numa proporção de 1/200 em solução de azul de Evans a 1%. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e novamente incubada em estufa por 30 minutos à 35°C e depois lavadas duas vezes em PBS (cinco minutos cada) e secas ao ar. Posteriormente, essas lâminas foram cobertas com glicerina tamponada e lamínulas 24x50, sendo observadas ao microscópio de imunofluorescência sob objetiva de 40x.

A reação foi considerada positiva nas diluições onde os taquizoítos apresentaram uma fluorescência verde na membrana celular, contra o fundo vermelho das formas coradas pelo azul de Evans. A ausência de fluorescência ou sua presença apenas na extremidade dos parasitos, conhecida como fluorescência polar, foi considerada como reação negativa. Todos os soros passaram por uma diluições iniciais de 1/16 e 1/32 para IgG e 1/8 e 1/16 para IgM. Os soros positivos passaram por diluições seriadas até a maior diluição considerada positiva. Durante todo o estudo foram utilizados soros controles positivos e negativos, o primeiro obtido de infecção experimental de camundongos com *T. gondii* e o segundo obtido de animais não infectados oriundos do biotério do IPTSP – UFG.

### 3.4.3. Avaliação histopatológica

As víceras foram coletadas durante a necrópsia dos camundongos infectados e controles, fixados em formalina 10% tamponada com fosfatos.

O material foi processado pelo método de inclusão em parafina, as lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina (Junqueira 1983) e analisadas no microscópio de luz (Axiostar plus, Zeiss). As alterações histopatológicas foram analisadas quanto à presença ou ausência de processos patológicos das células, do interstício, da circulação, do crescimento celular e inflamação. A intensidade dos processos patológicos gerais será analisada quanto à intensidade, considerando-se ausente, discreta (1-25%), moderada (26-50%) e acentuada (acima de 51%) de acordo com o comprometimento do corte analisado.



FIGURA 10. Início de Necropsia em camundongo BALB/c.

## 4.RESULTADOS

### 4.1. Estudo piloto

#### 4.1.1. Mortalidade de animais e contagem de cistos

O inóculo de 30 cistos mostrou-se com letalidade de 80%, enquanto que nos demais inóculos a sobrevivência foi de 100%. Os animais inoculados com 20 cistos formaram o grupo com maior número de cistos sem morte, estabelecendo-se este como número ideal para o experimento. A relação entre o número de cistos inoculados e o número encontrado nos cérebros destes animais pós-experimento é apresentada na tabela 1.

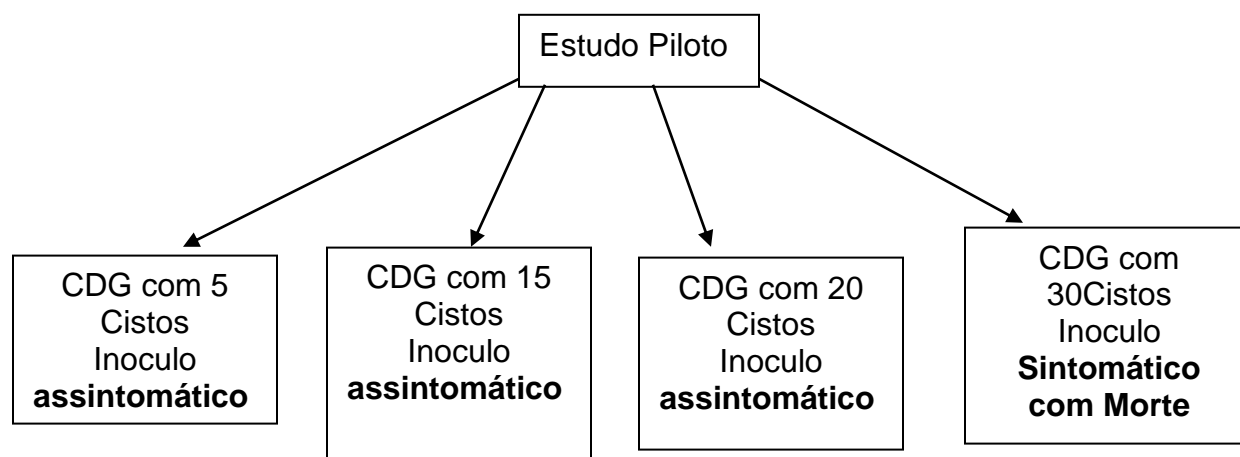


Tabela 1- Estudo piloto com o *T.gondii* em camundongo BALB/c por 60 dias:Relação do número de cistos inoculados por via oral e cistos contados pós experimento.

Camundongos infectados em grupos de cinco/n° de cistos inoculados							
N°de Cistos Inoculado	Número de cistos /0,1 mL					Média	Mortalidade
7	4	5	4	6	7	5,2	0
15	15	11	8	17	13	12,8	0
20	10	17	15	25	20	17,4	0
30	†	†	†	20	†	20	4

#### 4.1.2. Sorologia pela RIFI de todos os camundongos sobreviventes

Os camundongos BALB/c que sobreviveram tiveram o soro analisado pela RIFI e não apresentaram títulos de anticorpos para IgM, porém todos apresentaram títulos para IgG, confirmando-se, desta forma, a infecção pelo método sorológico. A relação entre o número de cistos inoculados e a titulação para IgM e IgG dos animais encontra-se na tabela 2.

Tabela 2. Sorologia dos camundongos sobreviventes comparativa com o número de cistos inoculados (curva de virulência).

Cdg por Cistos inoculados		Titulação			
		IgM 1/8	IgM/16	IgG 1/16	IgG1/32
Grupo 7 Cistos	C dg1	-	-	+	+
	C dg2	-	-	+	+
	C dg3	-	-	+	+
	C dg4	-	-	+	+
	C dg5	-	-	+	+
Grupo15 Cistos	C dg1	-	-	+	+
	C dg2	-	-	+	+
	C dg3	-	-	+	+
	C dg4	-	-	+	+
	C dg5	-	-	+	+
Grupo20 Cistos	C dg1	-	-	+	+
	C dg2	-	-	+	+
	C dg3	-	-	+	+
	C dg4	-	-	+	+
	C dg5	-	-	+	+
Grupo30 Cistos	C dg4	-	-	+	-

## 5.2. Terapia imunossupressora

### 5.2.1 RIFI do soro dos animais controle

Foi utilizado o soro dos camundongos controle infectados e não tratados (controle3) para o estabelecimento de um parâmetro que será usado para comparação com a sorologia dos camundongos infectados e tratados com as drogas imunossupressoras. Foram encontrados anticorpos anti *T.gondii* em todos os soros analisados, confirmando o sucesso da infecção. A tabela 3 mostra a relação dos títulos de anticorpos anti *T.gondii* encontrados no grupo controle de animais infectados e não tratados.

Tabela 3-Sorologia em camundongos do grupo controle três para estabelecimento de parâmetro sorológico de camundongos BALB/c infectados pela cepa do *Toxoplasma gondi*

	IgG 1/8	IgG1/16	IgG1/32	IgG1/64	IgG1/128	IgG1/256
Cdg1	+	+	+	-	-	-
Cdg2	+	+	+	+	-	-
Cdg3	+	+	+	-	-	-
Cdg4	+	+	+	-	-	-
Cdg5	+	+	+	-	-	-

### 5.2.2. RIFI do soro dos animais sobre tratamento imunossupressor

Dos 32 camundongos infectados com 20 cistos e tratados com as drogas imunossupressores nas dosagens, vias e esquemas propostos, não foi possível ser encontrado variação na titulação em comparação com a titulação usada como parâmetro (infectado e não tratado) que pudesse sugerir reativação da infecção crônica (Tabela 4).

Tabela 4-Sorologia dos grupos de camundongos BALB/ infectados com a cepa de *Toxoplasma gondii* e tratados em modelo com drogas imunossupressoras propostas

Grupo A	Cdg1	Cdg2	Cdg3	Cdg4	Cdg5	Cdg6	Cdg7	Cdg8
IgG1/8	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/16	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/64	-	+	-	-	-	-	-	-
Grupo B	Cdg1	Cdg2	Cdg3	Cdg4	Cdg5	Cdg6	Cdg7	Cdg8
IgG1/8	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/16	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/64	+	-	-	-	-	-	-	-
Grupo C	Cdg1	Cdg2	Cdg3	Cdg4	Cdg5	Cdg6	Cdg7	Cdg8
IgG1/8	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/16	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/64	-	-	-	+	-	-	-	-
Grupo D	Cdg1	Cdg2	Cdg3	Cdg4	Cdg5	Cdg6	Cdg7	Cdg8
IgG1/8	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/16	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/32	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG1/64	+	-	-	-	+	-	-	-

### 5.2.3. Avaliação clínica de camundongos tratados com drogas imunossupressoras

#### 5.2.4. Sobrevivência

No tratamento proposto aos camundongos, infectados e não infectados não apresentou alterações a sobrevivência dos camundongos avaliados e a associação de drogas não se mostrou tóxica.

#### 5.2.5. Sintomatologia

Dos três primeiros grupos avaliados não houve sintomatologia que pudesse caracterizar um quadro de reativação clínica. Porém o grupo 4 que recebeu a associação de Dexametasona, Azatioprina e acetato de cortisona apresentou 62,5% dos camundongos com alterações epidérmicas, diarreia, emagrecimento e dor ao toque, que podem sugerir um possível quadro de reativação, por comparação com o grupo controle 2 (Figura 8 e 9).

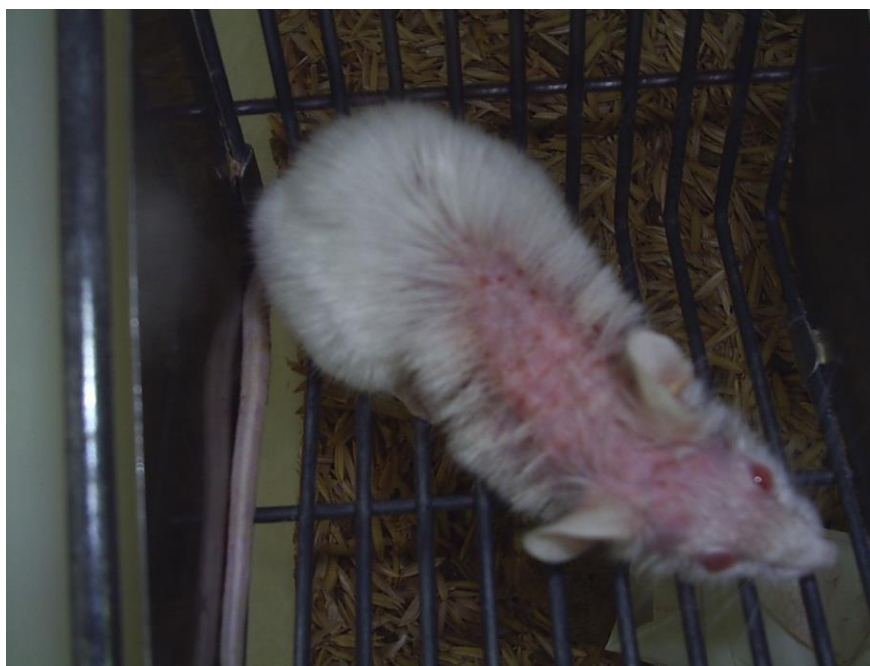


FIGURA 11. Camundongo BALB/c infectado com cepa de *Toxoplasma gondii* que receberam tratamento com a associação de Dexametasona+Azatioprina+Acetato de Cortisonado (Grupo 4) com alteração epidérmica semelhante alopecia.



FIGURA 12. Foto comparativa entre os camundongos com quadro semelhante a alopecia (Grupo 4) com camundongos tratado com associação das três drogas e não infectado(Grupo controle 2).

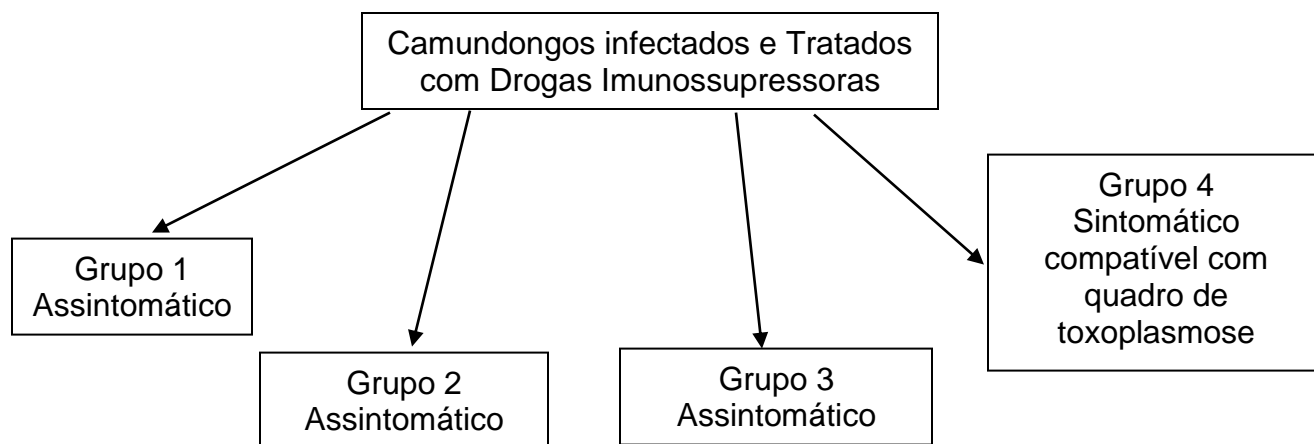


FIGURA 13: Organograma apresentando o resultado clínico do estabelecimento da infecção crônica por *Toxoplasma gondii*

### 5.3. Análise histopatológica

Dos 8 grupos avaliados e comparados que totalizaram 67 camundongos, foi retirado Fígado, Baço, Pulmão, coração, Cérebro para análise histopatológica. De cada grupo foram retirados por randomização 3 camundongos, que tiveram seus órgãos analisados.

#### 5.3.1. Estudo histopatológico de órgãos de camundongo

Pela análise histopatológica realizada nos órgãos dos camundongos infectados e tratados, não foi encontrada alterações histopatológicas condizentes com quadro de reativação de toxoplasmose, nem alterações nos grupos controle que fizeram uso das drogas e não foi encontrada a presença de cistos de *Toxoplasma gondii* nos corações e nos cérebros avaliados.

## 6. DISCUSSÃO

O *Toxoplasma gondii* têm sido responsabilizados por infecções naturais ou experimentalmente induzidas em animais de laboratório, tais como camundongos, ratos, hamsters e cobaias (Granato et al) Desta forma, a infecção experimental de animais de laboratório, em especial de camundongos, tem ajudado a entender aspectos patológicos e epidemiológicos dessa doença (Didier et al 2000).

Nesse sentido, vários modelos experimentais têm sido propostos para a compreensão desta parasitose. Observou-se inicialmente em estudo piloto com camundongos BALB/c um grande sucesso na reprodução da infecção com a cepa ME49, a viabilidade do uso da cepa por via oral nestes camundongos e com a mortalidade ocorrida foi possível estabelecer um número máximo de cistos para a infecção crônica durante o tempo proposto no modelo que foi de 60 dias, e chegando a uma visualização dos cistos da cepa ME49 no cérebro destes camundongos. Contudo na reprodução de um quadro de reativação de cistos de *Toxoplasma gondii* pela imunossupressão com drogas padrão, não se observou o mesmo resultado obtido com outros animais experimentais (Frenkel 1973 ; Sumyuen et al 1996 ; Djurkovic-Djakovic et al 2001) que levou a questionar a resistência do camundongo BALB/c ao *Toxoplasma gondii*

ou ao regime de drogas utilizadas, regime esse que propõe uma reprodução de esquemas terapêuticos de imunossupressão humana (Camargo et 1990 ; Ianhez 2001).

A análise geral dos resultados obtidos a partir do uso dos esquemas terapêutico imunossupressor proposto (dexametasona, azatioprina, acetato de cortisona) em camundongos machos BALB/c por 28 dias, não apresentou resultados sorológicos ou histopatológicos que pudessem ser associados ao quadro de reativação do *Toxoplasma gondii*, como foi observado em Frenkel 1973 que obteve reativação de toxoplasmose latente em hamster com a cepa RH (tipo I) ou em Sumyuen et al 1996, que obteve com camundongos Swiss e a cepa C uma mortalidade de 5% a 17%, pós uso de drogas imunossupressoras (Azatioprina e acetato de cortisona), ressaltando que a cepa C tem sua origem de placenta humana e quando inicialmente estudada e isolada era virulenta para os camundongos (Beauvais et al 1983), comparativamente em Djurkovic-Djakovic et al 2001 utilizou-se a cepa ME49, camundongos Swiss e a associação de dois corticóides, a dexametasona e acetato de cortisona, obtendo também resultados positivos, porém determinou-se um período de tratamento mais longo, cerca de sete semanas, período bem superior ao usado neste trabalho e sendo a dexametasona administrada na água para beber, podendo assim levar a um maior consumo pelo camundongo e convém lembrar que o prolongamento da administração dessas drogas mesmo em camundongos não infectados já causariam uma maior mortalidade, fato ressaltado pelo próprio autor.

Destacando os resultados obtidos pela sorologia em titulação pela RIFI, no soro dos camundongos tratados com as drogas imunossupressoras comparativamente com os títulos dos camundongos apenas infectados não se obteve um resultado com grande relevância estatística nas amostras, que pudessem caracterizar um quadro sorológico de reativação por uma variação. Contudo podemos levar em consideração a variável biológica no surgimento de títulos de IgG após a fase aguda, que em modelos imunossuprimidos podem vir a atingir uma maturidade após o período dois a três meses não seguindo a regra habitual, levando a conclusão que a sorologia pela RIFI para modelos imunossuprimidos podem ter seus resultados mascarados (Granato et al), incrementando a necessidade de diagnósticos mais sensíveis e eficientes para a infecção (Kompalic-Cristo et al 2005).

Neste estudo, amostras do cérebro, coração, fígado, baço e pulmão, de três animais de cada grupo incluindo os grupos controles, constituindo aproximadamente 90 amostras foram

cortados e corados com HE e confeccionadas três lâminas de cada amostra para a análise histopatológica, objetivando-se o encontro de estruturas compatíveis com processos patológicos causados pela droga e/ou pela presença do parasito e reativação do mesmo, para tal foram analisadas e comparadas com os seus respectivos controles, e feito uma busca por formas císticas, livres e lesões causadas pelo parasito como necroses multifocais, lesões no baço, pneumonites, infiltrados inflamatórios, hiperpásias, alterações inflamatórias entre outras (Haziroglu et al 2003), entretanto todos os órgãos avaliados não apresentaram nenhuma alteração que fosse compatível com lesões causadas pelo parasito ou pela toxicidade das drogas.

Comparando esse resultado com outros trabalhos onde o uso de inoculações intraperitoneais de taquizoítos com concentração de  $1 \times 10^6$  em camundongos causou lesões necróticas no fígado e no baço, hemorragias no crânio e nos pulmões além de pneumonia intersticial (Haziroglu et al 2003) e outros achados como em Frenkel JK 1988 que comentou as várias lesões causadas pela infecção toxoplásmica, nos leva a questionar a interação da cepa ME49 de *T. gondii* ao modelo murino com o camundongo BALB/c. Na presente investigação, o curso clínico da infecção foi o mais compatível com o quadro de reativação toxoplásmica, contrariando os demais resultados, devido aos achados na epiderme, funções intestinais, dor ao toque e com ocorrência de 62% no grupo que recebeu a associação das 3 drogas imunossupressoras (Dexametasona + Azatioprina + Acetato de Cortisona). Essas alterações são compatíveis com modelo humano como observado em Mies 1998, em que pacientes imunossuprimidos utilizando azatioprina vieram a apresentar um quadro de alopecia transitória, estomatites e alterações da mucosa intestinal, produzindo desconforto, cólicas e diarreia, estas situações se assemelha à descrita pelo modelo proposto.

Essa avaliação pode sugerir um melhor acompanhamento nos sinais clínicos quando se estiver fazendo o uso de drogas imunossupressoras associadas ou não a parasitos oportunistas como o *T. gondii*, tanto em modelo murino quanto em humano e se for financeiramente viável, o uso de técnicas sorológicas mais sensíveis por um período maior tempo devido à baixa avidéz neste modelo.

## **7.CONCLUSÕES**

1- Por métodos sorológicos não foi possível identificar a alteração por comparação de títulos com o surgimento de IgG entre os camundongos no modelo proposto ocorrendo o mesmo pela histopatologia realizada nos órgãos destes camundongos avaliados, toda via quando nos voltamos para a análise clinica foram encontradas alterações compatíveis com quadro de toxoplasmose aguda porem sem levar nenhum dos camundongos avaliados com as drogas a morte.

2- O potencial de risco da toxoplasmose neste modelo murino apresentou-se com baixa afinidade para a reativação, pela falta de mortalidade entre os camundongos avaliados .

## **7.1. Recomendações e sugestões**

Apesar de ocorrer um comprovado desenvolvimento de cistos com a cepa ME49 em camundongo isogênicos BALB/c, que caracteriza a infecção crônica por toda vida destes, podemos notar que em modelos que fizeram o uso do camundongo C57Bl/6 infectados com a mesma cepa obtiveram uma meningoencefalite progressiva com elevada taxa de mortalidade (Gazzinelli et al 1993) porém foi mantida um período de infecção por 12 semanas tempo menor que realizado neste.

Alem de usar um maior tempo na infecção, poderia se ter mantido um maior tempo no uso das drogas imunossupressoras que fugiria da proposta da reprodução da terapêutica humana, porém traria a possibilidade de mortes entre os camundongos avaliados.

O estudo sorológico poderia ocorrer depois do tempo normal para modelos não suprimidos levando a uma maior análise dessa baixa avidéz e demora no surgimentos de IgG

## **7.2. Análise e aceitação dos trabalhos**

Esta dissertação será convertida em dois artigos que serão submetidos à revisão de pelo menos dois pareceristas externos e enviadas para a aprovação das revistas: Memória da Fundação Oswaldo Cruz e para a revista Ciência Rural.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Almeida DR, Starling CE, Camargo LFA, Carvalho VB, Vila JH, Cunha CP, Guimarães GV, Clausell N, Perez GH, Carrara D 1999. Complicações após transplante cardíaco *Arq Bras Cardiol* v:73, (suplemento V).

Amato Neto V, Nagasse TK, Moreira AAB, Gomes AEC, Campos R 1984. Utilização em politransfundidos, da pesquisa de anticorpos IgM anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Toxoplasma gondii* para detectar infecções pos transfusionais recentes. *Rev.Inst.Med.Trop São Paulo* 26(2):83-6.

Amato Neto V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS 1995. Toxoplasmose, 4.ed.são Paulo, sarvier p:154.

Ambroise TP 2000. Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. *International Journal for Parasitology* 30:1361-1367.

Amendoeira, MRR, Da Costa T, Spalding SM. *Toxoplasma gondii* nicolle & manceaux, 1999 (apicomplexa sarcocystidae) e a toxoplasmose. *Revista Souza Marques* v:1, n:1, p:15-35.

Anthuber M, Sudhoff F, Schuetz A, Kenkes BM 1991. Donor transmitted infections in heart transplantation – HIV, CMV and toxoplasmosis. *Transplant Proc* 23:2634–2635.

Antunes F 1984. Toxoplasmose - Estudo da epidemiologia e da infecção congênita na região de Lisboa. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Araújo FG 1970. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. *Rev.Inst.Med.Trop São Paulo* 12(2):105-11,1970.

Ashburn D 1998. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J Clin Pathol* v: 51, p: 312-5.

Azevedo DS, Jamra LMF, Ribeiro MF 1983. Isolamento de oocisto de *Toxoplasma gondii* em dois bairros de Recife (PE) *Rev. Inst. Med. Trop São Paulo* 25(1):31-36.

Bastien P 2002. Diagnosis. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* v :96 supl :1 p : 205-15.

Beaman MH, Wong SY, Remington JS 1995. Toxoplasmosis: Principles and practice of infectious diseases. 4 ed. New York: *Churchill Livingstone* p: 2455-2475.

Beauvais B, Derouin F, Grall P, Lorailhere P, Larivière M 1983. Toxoplasmose et mort foetale. *Rev Fr Gynecol Obstet* 77:209–211.

Bergström T 1998. Congenital *Toxoplasma gondii* infection diagnosed by PCR amplification of peripheral mononuclear blood cells from a child and mother. *Scand J Infect Dis* v:30 p:202-4.

Beverley JKA 1973. A new look at infectious diseases. Toxoplasmosis. *Br Med J* v:2 p: 475-8.

Bernsteen L, Gregory CR, Aronson LR, Lirtzman RA, Brummer DG 1999. Acute toxoplasmosis following renal transplantation in three cats and a dog. *J. Am. Vet. Med, Ass* 215:1123-1126.

Bhopale GM 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis* 26: 213–222.

Blanc-Jouvan M 1996. Chorioretinitis following liver transplantation: detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. *Clin Infect Dis* v:22 p:184-5.

Braz LMA, Di Pietro AO, Amato neto V, França OS 1999. Evaluation of the efficacy of azithromycin and pyrimethamine, alone or in combination, for the treatment of experimental infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *Rev. Soc. Med. Trop* 32(4):401-403.

Bonametti AM, Passos JN, Da Silva EM, Bortoliero AL 1997. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* v 30 n 1

Boothroyd JC, Grigg ME 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5: 438-442.

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H 1976. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6(4):468-75.

Bou G 1999. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* v:37 n:11 p: 3465-8.

Bovo F, Souza RF, Soza-gomez DR, Moscardi F, Paro FE, Itano EN, Ono MA 2005. Produção de anticorpos policlonais para lectina de hemolinfa de *anticarsia gemmatalis*

Buchbinder 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* v:45, p:269-71.

Burdmann E, Zanini AC, Abensur H 2004. Monitoramento e toxicidade de drogas utilizadas em transplante. Equivalência farmacológica das drogas nos transplantes. *Int. J. Braz. J. Urol* v: 29 Suppl:2 p:57-62

Burg JL 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* v:27 n:8 p:1787-92.

Calabrese EJ 1991. Principles of animal extrapolation. Michigan: Ed. Lewis Publishers.

Caiaffa WT, Chiari CA, Figueiredo AR, Orefice S, Antunes CM 1993. Toxoplasmosis and mental retardation - report of a case control study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88:253-61.

Camargo ME 2001. Toxoplasmose. In: Ferreira and Ávila, Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Guanabara-koogan, Rio de Janeiro, 2<sup>o</sup> edição. P: 278-287.

Camargo PR, Mazzieri R, Snitcowsky R, Rattl M, Costa R, Higuchi, ML, Albuquerque, A M T, Meneghetti C, Ebaid M, Pileggi F 1990 Drogas imunossupressoras no tratamento da miocardite ativa na criança: avaliação hemodinâmica.

Cantos GA 2000. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev ass med Brasil* v:46 n:4 p:335-41.

Carvalho CMCN, Farhat C K 1999. Acquired toxoplasmosis. *J Pediatr* v:75 supl:1 p: S63-S67.

Cimerman B, Cimerman S 1999. Parasitologia Humana e seus Fundamentos gerais. In: Amato Neto V, Marchi CR. Toxoplasmose. Ed. Atheneu, São Paulo, p.151-181.

Contini C, Seraceni S, Cultrera R 1999. Different PCR systems to detect *Toxoplasma gondii* tachyzoites or bradyzoites in clinical specimens from patients with and without overt disease. *J Eukaryot Microbiol* v:46 n:5 p:77S-78S.

Coutinho SG, Souza WJS, Camillo-Coura L, Marzochi MCA, Amendoeira MRR 1981. Levantamento dos resultados das reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 6079 pacientes de ambulatórios ou gestantes no Rio de Janeiro realizado nos anos de 1971 e 1977. *Rev. Inst. Med. Trop São Paulo* 23(2):48-56.

Couvreur J, Thulliez P 1996. Toxoplasmose acquise a localisation oculaire ou neurologique. *Presse Med* 25: 438-442.

Da Silva DS 2003. Caracterização parasitológica e genética de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas domésticas (*Gallus domesticus*) nos municípios de Campos dos Goytacazes, Conceição de Macabú e Carapebus/RJ. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense-Campos dos Goytacazes- Rio De Janeiro.

Dardé ML 1992. Biodiversity in *Toxoplasma gondii* . *Cur. Top. Mic. And immunology* 219:27-41.

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. *J. Parasitol* 78:786–794.

Decoster A 1995. Detection of anti-Toxoplasma immunoglobulin A antibodies by Platelia-Toxo IgA directed against P30 and by IMx Toxo IgA for diagnosis of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* v:3 n:8 p:2206-8, 1995.

Denney CF 1999. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity* v:67 n:4 p:1547-1552.

Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Bennouna S 2004. Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. *Int J Parasitol* 34: 411–421.

Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJF, Larivière M 1992. Toxoplasmosis in bone marrow transplant recipients: report of seven cases and review. *Clin Infect Dis* 15: 267–270.

Devada K, Anandan R, Dubey JP 1998. Sorologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in madras, india. *J. Parasitol* 84(3):621-622.

Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect* 2:709-20.

Diniz EMA, Camargo ME, Costa Vaz FA 1991. Toxoplasmose congênita.in Diniz EMA, Costa Vaz FA. Toxoplasmose congênita e perinatais.São Paulo,Atheneu,1991 p:31-72.

Djurkovic-Djakovic O, Milenkovic V 2001.Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii* . *Acta protozool* 40: 99 – 106

Dubey, J.P1992. Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. *Vet Parasitol, Amsterdam* v.44 n.3-4 p. 305-309.

Dubey JP 1998a *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperaturea. *J. Parasitol* 82:957-61.

Dubey JP 1998b. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int j parasitol* 28: 1019-1024.

Dubey, JP 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol* 87: 215–219.

Dubey JP 2004. Toxoplasmosis- a waterborne zoonosis. *Vet parasitol* 126: 57-72.

Dubey 2005 in:Mandell GL, Bennet R,.Principles and practice diseases.Elsevier, philadelphia

Dubey & Frenkel 1972 .Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool* 19:155-177.

Dubey JP, Beattie CP 1988. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, Fl:Crc Press P:1-220.

Dubey JP, Odening K 2001. Toxoplasmosis and related infections. In: Samuel B, Píbur M, Kocan AM *Parasitic Diseases of Wild Animals*, Iowa State University Press, Ames. P: 78–519.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA 1998a. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol Rev* 11: 267–299

Dubey JP, Thayer DW, Speer CA, Shen SK 1998b. Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int. J. Parasitol* 28(3): 369-375.

Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OCH, Blixt JA 1997. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* 83: 870-872..

Dubey JP, Graham DH, Da Silva DS, Lehman T, Bahia-Oliveira LM 2003a. *Toxoplasma gondii* isolates of free-range chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype and oocyst shedding by cats. *J parasitol* 89: 851-853

Dubey JP, Levy MZ, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK, Dahl E, Thulliez P, Lehmann T 2004. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *J Parasitol* 90: 1015-1018.

Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudêncio L, Sreekumar C, Vianna MCB, Lehmann T 2003b. characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Paraná, Brazil. *Vet Parasitol* 117: 229–234

Ellis JT 1998. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J Parasitol* v:28 p:1053-60.

Fagundes DJ, Taha MO 2004. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir. Brás* v19 n1 São Paulo.

Fazaeli A, Carter PE, Darde ML, Pennington TH 2000. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. *Int J.Parasitol* 30:637-642.

Ferguson DJ 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol* 18: 355–359.

Ferrarone JJ, Lacaz CS 1982. Prevalência de anticorpo contra agentes causadores de hepatite, malária, sífilis e toxoplasmose em cinco populações humanas distintas da Amazônia Brasileira. *Rev. Inst. Med. Trop São Paulo* 24(3):155-61.

Ferreira GLS 2005. Mastócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 e a susceptibilidade a infecção por *Toxoplasma gondii* (cepas RH e ME-49). Tese de doutorado pela Universidade federal de Uberlândia/Instituto de Ciências Biomédicas.

Ferreira MS 2000. Infections by protozoa in immunocompromised hosts mem. *Inst. Oswaldo Cruz*, v.95 s.1 Rio de Janeiro suppl. I: 159-162.

Figueiró-Filho EA; Lopes AHA, Senefonte RA, Souza Júnior VG, Botelho CA, Figueiredo MS, Duarte G 2005. Diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet* v:27 n:8 Rio de Janeiro

Filisetti D, Candolfi E 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità* 40: 71-80.

Finamor LP, Finamor F, Muccioli C 2002. *Corticosteroid therapy and uveitis. Arquivos Brasileiro de Oftalmologia*, v 65-fascículo 4.

Fletcher HR, Fletcher SW, Wagner EH 1996. Epidemiologia clínica: elementos essenciais. Porto Alegre: Ed Artes Médicas.

Frenkel JK 1960. Evaluation of infection-enhancing activity of modified corticoids. *Proc soc exp biol med* 103:552–555.

Frenkel JK 1988. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today* 4 (10): 273-278.

Frenkel JK 1996. Toxoplasmose. In: r Veronesi & r Focaccia, Tratado de infectologia, atheneu São Paulo p:1290-1305.

Frenckel JK 2002. Toxoplasmose. In: Veronesi. Tratado de infectologia. 2a ed. São paulo: atheneu P:1310-25.

Frenkel JK, Dubey JP & Miller NL 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167(919): 893-896.

Fuentes I 1996. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* v :34 n :10 p :2368-71.

Galisteo JR AJ 2004. *Toxoplasma gondii* vs. Radiação ionizante: Estudo da imunidade intestinal em camundongos C57/BL6j experimentalmente vacinados com taquizoítos irradiados. Instituto de Pesquisas Energéticas e nucleares. Dissertação de mestrado em ciência na área de tecnologia nuclear.

Garcia JS, Navarro IT, Ogawa I, Oliveira RC, Garcia SMF, & Leite J 1999. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela tela de amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, Pr, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 32(6): 671-676.

Gavrilescu LC, Denkers EY, 2001. IFN-overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol* 167: 902–909.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A 1993. Interleukin-12 is required for T lymphocyte independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T Cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci* 90: 6115–9.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Junior M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA, & Belfort Junior R 1992. An unusually high Prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am. J. Ophthalmol* 114(2): 136-144.

Godard ALB 2001. Manipulação de animais. Manual de biossegurança parte IV.

Goldsmith RS 1998, Infectious Diseases: Protozoal & Helminthic in: *Current Medical Diagnosis & Treatment*, 37th Edition Stamford, Connecticut, USA: Appleton & Lange.

Granato et al. Avanços do Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas

Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC 2001. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294: 161-165.

Grob U 1992. Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 33-9.

Grujić J, Djurković-Djaković O, Nikolić A, Klun I, Bobić B 2005. Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25: 226–230.

Guimarães ACS, Kawarabayashi M, Borges MM, Tplezano JE, Andrade Jr HF 1993. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Rev. Inst. Med. Trop São Paulo* 35(6):479-83.

Guimaraes ACS, Kawarabayashi M, Nunes EV, Ferraz SN, Chiosini CB, Tolezano JE, 1997. Experimental toxoplasmosis, and immunosuppression. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 52:316-20.

Hall SM, Pandit A, Golwilkar A, Williams TS 1999. How do Jains get *Toxoplasma* infection? *Lancet* 354: 486-487.

Handman E, Remington JS 1980. Responses to *Toxoplasma* Antigens in Mice Infected with Strains of Different Virulence. *Infection and Immunity* p 215-220 Vol. 29 N1.

Haziroglu R, Altintas K, Atasever A, Lbahar MYG, Tunca OKR 2003. Pathological and Immunohistochemical Studies in Rabbits Experimentally Infected with *Toxoplasma gondii*. *Turk J Vet Anim Sci* 27: 285-293.

Hill D, DUBEY JP 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* (8) 634-640.

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

Howe DK, Summers BC, Sibley LD 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun* 64: 5193–5198.

Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35(6):1411-1414.

Hunter C, Subauste C, Remington J 1994. The role of cytokines in toxoplasmosis. *Biotherapy* 7: 237-47.

Israelski DM, Tom C, Remington JS 1989. Zidovudine Antagonizes the Action of Pyrimethamine in Experimental Infection with *Toxoplasma gondii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, *American Society for Microbiology* p. 30-34

Ianhez LE 2001. Individualização da Imunossupressão. *Revista pratica hospitalar*, Nº 14

Jacquier P, Zufferey J, Wunderli W 1995. Biological diagnosis of toxoplasmosis in the course of pregnancy: methods, interpretations and practical recommendations. *Schweiz. Med.Wochenschr* Suppl 65:39-51.

Jaqueti J, Hernández-García R, Nicolás D, Martínez HD, Navarro GF 1991. Serologia frente a *Toxoplasma gondii* en mujeres gestantes. Evolución de tasas de prevalência a lo largo de cuatro años. *Rev. Clin. Española* 188, 6, 278-9.

James GS 1996. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. *J Clin Microbiol* v :34 n :6 p :1572-5.

Jamra LMF, Guimarães EC 1981. Conversão sorológica para toxoplasmose em crianças de um centro de saúde de São Paulo. *Rev.Inst.Med.Trop São Paulo* 23(3):133-7.

Janku J 1923. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lutea in eye of normal dimensions, and in microphthalmic eye, with parasites in the retina.

*Cas. Lek. Cesk* 62: 1021-1027, 1081-5, 1054-9, 1111-5, 1138-44

Jensen L, Peterson E, Henriksen SA, Dietz HH, Lind P 1998. Monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii* strain 119 identify isolated Danish strains as one group. *Int. J. Parasitol* 28:1305-1313.

Joag SV, Li Z, Foresman L, Pinson DM, Raghavan R, Zhuge W 1997. Characterization of the pathogenic KU-SHIV model of acquired immunodeficiency syndrome in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:635-45

Johnson JD 1993. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis. *J Infect* v:26 p:147-58.

Joss AWL 1993. Toxoplasma polymerase chain reaction on experimental blood samples. *J Med Microbiol* v:38 p:38-43.

Junqueira LCU. Técnicas básicas de citologia e histologia. 1º edição, São Paulo: Santos. 1983.

kasper and Boothroyd 1992, *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: Immunology and molecular biology of parasitic infections. 3º edição ed. Blackwell scientific publications. Edited by Kenneth s warren.

Kawazoe U 2003. Toxoplasma gondii. In dp neves, parasitologia humana, atheneu, São Paulo p:147-156.

Khalifa KES 1994. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* v :32 n :11 p :2813-9.

Kirk AD 2006. Induction Immunosuppression. *Transplantation* 82: 593–602.

Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O 2005. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n.4, p. 229-35.

Korhonen MH 1999. A new method with general diagnostic utility for the calculation of Immunoglobulin G Avidity. *Clin. Diagn Laboratory Immunology* 6 (5) : 725-728.

Kountz DS, Clark CL 1997. Safely withdrawing patients from chronic glucocorticoid therapy. *Commented on Am Fam Physician* 56:736-7, 55:521-5, 529-30.

Kusne S, Dummer JS, Ho M, Whiteside T, Rabin BS, Makowka L, Esquivel CO, Starzl TE 1986. Self limited Toxoplasma parasitemia after liver transplantation. *Transplantation* 44: 457–458

Lamoril J 1996. Detection by PCR of Toxoplasma gondii in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. *J Clin Pathol* v:49 p:89-92.

Lappalainen M, Sintonen H, Koskiniemi M, Hedenan K, Ammala P, Terama K, Koskela P 1995. Cost - benefit analysis of screening for toxoplasmosis during pregnancy. *Scand. J.Infect. Dis* 27(3) 265- 72.

Lazzarotto T 1999 . Anticytomegalovirus (anti-CMV) Immunoglobulin G avidity in Identification of Pregnant Women at Risk of transmitting congenital CMV Infection. *Clin. Diagn. Laboratory Immunology* 6 (1) 127-129

Lehmann T, Blackston CR, Parmley SF, Remington JS, Dubey JP 2000. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and house keeping genes. *J. Parasitol* 86:960-971.

Lescano SAZ, Amato Neto V, Pedro P. Chieffi PP, Rita C. Bezerra RC, Gakiya E, Ferreira CS, Braz LMA 2004. Avaliação da eficácia da azitromicina e pirimetamina em camundongos

infectados por cepa cistogênica de *Toxoplasma gondii*. *Rev da Soc. Bras de Méd. Trop* 37(6):460-462.

Leser PG 2000. A utilização do teste de avidéz de IgG para auxiliar a interpretação das reações sorológicas para toxoplasmose com IgM positiva. *Rev Soc Bras Med Fetal* v:5 p:16-20.

Levaditi C, Schoen R, Sanchis Bayarri V 1928. L'encéphalomyélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. *C R Séances. Soc Biol Fil* 99:37±40.

Levin J 1987. Estatística aplicada a ciências humanas. São Paulo: Ed Harbra.

Lindsay DS, Collins MV, Mitchell SM, Cole R, Flick G, Wetch CN, Lindquist A, Dubey JP 2003. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in sea water. *J Eukaryot Microbiol* 50: 687–688.

Literak I, Rychlik I 1999. Genome changes in the *Toxoplasma gondii* strains during laboratory passages in mice. *Acta Veterinaria Brno* v. 68, n. 3, p.203-208.

Luft BJ 1989. *Toxoplasma gondii*. In: PD Walzer & RM Genta, Parasitic infections in the compromised host, Marcel Dekker editors, New York. p 179-279.

Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS 1984. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J Am Med Assoc*, 252: 913-917.

Lynette AH 1998. Responsible conduct with animals in research. England: Oxford Univ. Press.

Lyons RE, Mcleod R, Roberts CW 2002. *Toxoplasma gondii* tachizoitebradyzoite interconversion. *Trends in Parasitology* 18 (5): 198-201.

Lyons AS, Petrucelli RJ 1987. Medicine: an illustrated history. New York: Ed. Harry N. Abrams Inc.

Mangold U 1999. Morphological and chemical investigations of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.): preliminary report in regard to the causes of their population decline. *Zeitsch Jagdwissen* v. 45 n. 2 p. 139-146.

Martínez-Carrasco C, Bernabé A, Ortiz JM, Alonso FD 2005. Experimental toxoplasmosis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol* (130) 55-60

McAllister MM 2005. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of "subclinical toxoplasmosis". *Vet Parasitol* 132: 241-247.

Mcevoy GK, Litvak K, Welsh OH 1996. Editors. AHFS Drug information. Bethesda, Md: *American Society of Health-Systems Pharmacists*.

Mcleod R, Skamene E, Brown CR 1989. Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of AxB/BxA recombinant inbred and B/O congenic mice. *J Immunol* 143:3031-3034.

Mies S 1998. Transplante de fígado. *Rev. Assoc. Med. Bras*, v.44 n.2 São Paulo.

Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RWG, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB 2006. Immunosuppression: Evolution in Practice and Trends, 1994–2004. *American Journal of Transplantation* 6 (2): 1111–1131

Mei-Hui I 2000. Real time PCR for quantitative detection of *toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* v:38 n:11 p:4121-5.

Mondragón R, Howe DK, Dubey JP 1998. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol* 84:639-641.

Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley, LD 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* 167: 4574–4584.

Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *The lancet* 363: 1965-1974.

Moss JE 1999. The regulation of apoptosis by microbial pathogens. *International Review of Cytology* v:187 n:3 p:203-259.

Neves DP 2003. *Parasitologia Humana* .10<sup>a</sup>ed. São Paulo.editora Atheneu p:147-156.

Neves DP 1985. *Parasitologia Humana*. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. Atheneu p: 141-153.

Nguyen TD 1998. Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses. *Infection and Immunity* v:66 n:6 p:2991-2995.

Nicolle C, Manceaux L 1908. Sur une infection a; corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci* 147: 763-766.

Nicolle C, Manceaux L 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci* 148: 369-372.

Nilamadhab K, Baikunthanath M 2004. Toxoplasma seropositivity and depression: a case report SCB Medical College.

Nunn JF 1996. Ancient egyptian medicine. London: Ed. British Museum Press.

Oliveira LMGB, Oliveira AMWA, Azevedo SJ, ORÉFICE F 2001.Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. In: Peterson E, Pollak A, Owona IR. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *Intern. J.Parasitol* 31:115-44.

Owen Mr ,Trees AJ 1999. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J. Parasitol* 85:382-384.

Passos LN, Filho OFA, Andrade JR HF 2000. Toxoplasma Encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev. Inst. Med. Trop* 42 (3): 141-145.

Park BK, Moon HR, Yu JR, Kook J, Chai JY, Lee SH 1993. Comparative Susceptibility of Different Cells Lines of culture of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Korean J. Parasitol* 31 (3): 215-222.

Petersen E, Pollak A & Reiter-Owona I 2001. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol* 31(2): 115-144.

Pelloux H 1996. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* v :138 p :11-5.

Pereira MF, Silva DA, Ferro EA, Mineo JR 1999. Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:103-14.

Pfefferkorn ER, Rebhun S, Eckel M 1986. Characterization of an indoleamine 2,3 dioxygenase induced by gamma- interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res* 6(3):267-79.

Pinkerton H, Weinman D 1940. Toxoplasma infection in man. *Arch Pathol* 30: 374-392.

Porter SB, Sande M 1992. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med* 327: 1643-48.

Ravel R 1998. Aplicações Clínicas de dados Laboratoriais. Rio de Janeiro, 6ªed.

Reiter-Owona I 1999. The past and present role of the sabin-feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ* v:77 n:11 p:929-35.

Remington JS, Mcleod R & Desmonts G 1995. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S. & Klein, J.O (EDS). Infectious Diseases of the fetus & newborn infant. 4th edition, W.B. Saunders Company, pp. 140-268.

Renoult E, Chagbot F, Aymard B, Hestin D, Delorme N, Biava MF, Kures L, Kessler M 1991. Generalized toxoplasmosis in two renal transplant recipients which received a kidney from the same donor. *Rev Infect Dis* 13: 180–181.

Rey L 1991. Parasitologia. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan.

Roberts F, Mcleod R 1999. Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Parasitol Today* 15: 51-57.

Robert F, Ouatas T, Blanche P 1996. Évaluation rétrospective de la détection de *Toxoplasma gondii* par réaction de polymérisation en chaîne chez des patients sidéens. *Presse Méd* 25:541-545.

Rodier MH, Berthonneau J, Bourgoïn A, Geraudeau G, Burucoa C, Hekpazo A, Jacquemin JL 1995. Seroprevalences of toxoplasma, malaria, rubella, cytomegalovirus, HIV and treponemal infections among pregnant women Cotonou, Republic of Benin. *Acta Tropical* 59:271-77.

Rossi CL 1998. A simple, rapid enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunoglobulin g antibody avidity in toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* v: 30 p: 25-30.

Rutkow I 1993. Surgery: an illustrated history. Missouri: Ed. Mosby Inc. St Louis.

Sabin AB, Feldman HA 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (toxoplasma). *Science* 108: 660-3.

Saeij JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21(10).

Saiki RK 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* v:230 p: 1350-4.

Salén JCW 1995. Animal models: principles and problems. In: Rollin BE, Kesel ML. The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species. 3ed. Boston: CRC Press.

Santana RM, Andrade FM, Moron AF 2003. Infecções TORCH e gravidez. *Atualização terapêutica*, 21a ed. São Paulo: artes médicas p:1111-2.

Schreiber RD, Feldman HA 1980. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma gondii* as the classical complement pathway. *J Infect Dis* 141: 366-369.

Sergio M, Thomson MP, Almeida MD, Guardiã BD 2005. *Transplantes Hepáticos Liver transplants*

Server JL, Ellenberg JH, Ley AC 1988. Toxoplasmosis; Maternal and pediatric findings in 23,000 pregnancies. *Pediatrics* 82:181.

Sharma SD 1990. Immunology of toxoplasmosis. In: DAVID, J.W. Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects. *New York: WD Freeman* p:184-199.

Sher A, Sousa CR 1998. Ignition of the type I response to intracellular infection by dendritic cell derived interleukin-12. *Eur Cytokine Netw* 9: 65–8.

Sibley LD 2003. Recent origins among ancient parasites. *Vet Parasitol* 115: 185–198.

Sibley LD, Boothroyd JC 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature London* 359:82-85.

- Sibley LD, Howe DK 1996. Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr top microbiol*.
- Silva LA, Vieira RS, Serafin LN, Carlotti Junior CG, Figueiredo JFC 2001. Relato de caso *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 34(5): 487-490.
- Silveira C 2001. Toxoplasmose - Levantamento bibliográfico de 1997 a 2000. *Arq Bras Oftalmol* 64:263-70
- Skinner LJ 1989. The use of an IgM immunosorbent agglutination assay to diagnose congenital toxoplasmosis. *J. Med Microbiol* p:125-8.
- Splendore A 1908. Un nuovo protozoa parasita de conigli encontrado nelle lesione anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kalazar dell'uomo: nota preliminare. *Rev Soc Sci* 3: 109-112.
- Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M 1992. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Review* 339(8809):1579-82.
- Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299: 414–16.
- Su C, Howe DK, Dubley JP, Ajioka JW, Sibley SD 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proceedings. National Ac. Sc*, 99:10753-58.
- Sumyuen MH, Garin YIF, Derouin F 1996. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol Res* 82:681–686.
- Suzuki Y, Joh K, Orellana MA 1991. A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. *Immunology* 74:732-739.
- Suzuki Y, Wong S-Y, Grumet 1996. Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J Infect Dis* 173:265-268.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258.

Torres CM 1927. Affinité de l'Encephalitozoon chagasi agent étiologique d'une méningoencephalomyélite congénitale avec myocardite et myosite chez l'homme. *C.R. Soc.Biol* 97:1797-1799.

Wayne-Flye M 1989. History of transplantation. In: Wayne-Flye M, editor. *Principles of transplantation*. London: Saunders p: 1-17.

Weinman & Chandler 1954. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proc.Soc.Exp.Biol* Oct 87(1):211-6

Vergara TRC 1985. Epidemia de toxoplasmose do sistema nervoso central em enfermos com AIDS na cidade do Rio de Janeiro. *Bras. Méd* 59 (6): 397-406.

Veronesi, R 2002. Tratado de infectologia. 2ª. Ed. São Paulo: Editora Atheneu p:204-217.

Vischer TL, Bernhein C, Engelbrecht E 1967. Two cases of hepatitis due to *Toxoplasma gondii*. *Lancet* 11: 919-920.

Volker TH 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol* v:31 n:1 p:1166-1176.

Zoorob RJ, Cender D 1998. A different look at corticosteroids. *Am Fam Physician* 59:213.

