
**PERFIL SOROLÓGICO DE CAMUNDONGOS
CRONICAMENTE INFECTADOS
COM A CEPA CISTOGÊNICA ME-49 DE *Toxoplasma gondii*
ANTES E APÓS TERAPÊUTICA ESPECÍFICA**

*Liliane Rego Guimarães, Aline Almeida Barbaresco e Ana Maria de Castro*¹

RESUMO

Neste trabalho, foi avaliado o perfil sorológico experimental, após terapêutica específica, em camundongos BALB/c infectados com cepa cistogênica ME-49. Foram inoculados, individual e intraperitonealmente, 45 animais com dez cistos da cepa ME-49. Os camundongos foram divididos em três grupos de 15 animais e um grupo controle com cinco animais não infectados e não tratados, todos acompanhados ao mesmo tempo, diariamente, durante 20 dias. Após este período, foram subdivididos em dois grupos – A e B – e submetidos a esquemas terapêuticos específicos: grupo A – pirimetamina e ácido fólico; grupo B – pirimetamina, ácido fólico e sulfadiazina por dez dias consecutivos. A partir do quinto dia de tratamento, um camundongo de cada grupo foi anestesiado para a coleta de sangue por punção cardíaca, fazendo-se a análise do soro pela técnica de imunofluorescência indireta. Os animais tratados apresentaram diminuição significativa nos títulos de anticorpos (IgG) em relação ao grupo de infectados e não tratados. Entre as amostras analisadas com diferentes esquemas terapêuticos não houve diferença significativa. Isso mostra que o tratamento precoce da toxoplasmose reduz rapidamente os níveis de IgG, sugerindo uma possível cura desta parasitose.

DESCRIPTORIOS: *Toxoplasma gondii*. Tratamento. Cepa cistogênica ME-49.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, zoonose decorrente da infecção pelo *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) descrita há um século, é uma das protozooses mais prevalentes no mundo. Sua importância clínica está relacionada principalmente a indivíduos imunocomprometidos ou aos casos de transmissão congênita. É uma doença sistêmica severa e uma das principais causas de abortos e sequelas graves

1 Laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano, Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás.

Endereço para correspondência: Liliane Rego Guimarães, Rua 235 esquina com 1ª Avenida s/n, Setor Leste Universitário, CEP 74605-050, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: ilrgabed@hotmail.com

Recebido para publicação em: 4/2/2009. Revisto em: 26/6/2009. Aceito em: 14/12/2009

nos recém-nascidos (Remington, 1968; Desmonds & Covreur, 1974; Frenkel et al., 1975, Ruskin & Remington, 1976). Sua relevância no âmbito da saúde pública reside no fato de representar significativa causa de morbidade neonatal, com ocorrência de lesões oculares de intensidade variável e alterações cerebrais graves (Frenkel, 1973). Para evitar as sequelas da transmissão congênita, é essencial o diagnóstico precoce tanto da gestante de risco como do recém-nascido, pois o tratamento específico da mãe tem demonstrado ser capaz de reduzir a taxa de transmissão para o feto, melhorando o prognóstico do recém-nascido (Hohlfeld et al., 1990; Foulon et al., 1994).

A confirmação da infecção materna é baseada principalmente no perfil sorológico por meio da pesquisa de anticorpos específicos (IgM, IgG, teste de avidéz da IgG). Quando não é possível uma conclusão com os resultados imunológicos, os exames parasitológicos podem auxiliar no diagnóstico pela detecção do parasito principalmente no líquido amniótico, sangue fetal e líquido do recém-nascido, caracterizando, assim, a infecção ativa pelo *T. gondii*. Esses exames atualmente são auxiliados pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), que tem se mostrado importante instrumento de detecção do parasito graças à sua elevada sensibilidade. Mas, como toda técnica parasitológica, necessita de um número mínimo de parasitos para ser positiva. Assim, a inoculação em animais experimentais continua sendo uma opção nos casos inconclusivos, além de ser um importante método utilizado no isolamento do parasito para estudos biológicos, moleculares e bioquímicos. Uma das desvantagens da inoculação de material biológico é o tempo para obtenção do resultado (até três meses). Após 30 dias da inoculação os animais que não apresentarem sintomatologia e em seu exsudato não forem visualizados taquizoítas do *T. gondii*, será necessária a realização de, no mínimo, dois repiques com macerado do cérebro e/ou do próprio exsudato em um novo grupo de animais para a confirmação ou exclusão definitiva da infecção experimental. A positivação da sorologia dos camundongos inicialmente inoculados com o material biológico confirmará a infecção, não sendo necessários novos repiques e, conseqüentemente, haverá a redução do tempo para liberação do resultado.

Acompanhando recém-nascidos infectados (diagnosticados e tratados com terapêutica específica prolongada) no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG), observou-se, em muitos casos, a negativação da sorologia após o tratamento. Com base nessa observação e ante a necessidade de dinamizar a infecção experimental, realizou-se o bioensaio experimental com a cepa ME-49 (cistogênica) de *T. gondii*. O objetivo foi analisar experimentalmente a curva sorológica da toxoplasmose antes e após o tratamento específico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem do estoque: A cepa ME-49 era mantida por repiques a cada 60 dias em camundongos BALB/c.

Infecção experimental: Os animais foram inoculados via intraperitoneal com dez cistos/camundongo da cepa ME-49 diluídos em 0,1 mL de solução salina estéril, obtidos de camundongos anteriormente infectados.

Curva sorológica da cepa ME-49: Dos 50 camundongos utilizados, 45 foram infectados por via intraperitoneal. Cada animal recebeu 0,2 mL de macerado cerebral contendo dez cistos e cinco animais não foram infectados (controle negativo). Após 20 dias de infecção, os 45 animais infectados foram divididos em três grupos de 15 animais: dois de animais tratados (grupo A e grupo B) e um grupo formado de animais infectados e não tratados (grupo C). O tratamento instituído foi realizado por dez dias consecutivos. O grupo A foi tratado com pirimetamina (1mg/kg/dia) e ácido fólico e o grupo B, com pirimetamina (1mg/kg/dia), ácido fólico e sulfadiazina (100mg/kg/dia). As drogas foram diluídas com solventes adequados em farmácia de manipulação (Farmadoro SA) e administradas por gavagem, de acordo com o peso dos animais, num volume de 0,1 mL de solução. Após 30 dias de infecção, os camundongos começaram a ser sacrificados por deslocamento cervical a cada cinco dias, com coleta de uma amostra de sangue de cada animal por punção cardíaca, sendo os soros separados para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos e Animais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CEPMHA/HC/UFG) parecer nº 036/08.

RESULTADOS

Curva sorológica experimental da cepa ME-49 antes e após a terapêutica específica: A análise da variação das imunoglobulinas antes e após a terapêutica foi feita com camundongos cronicamente infectados. A IgG começou a ser detectada a partir do décimo dia de infecção, com seu pico no 20º dia, apresentando título de 1/160. Os camundongos infectados e não tratados apresentaram títulos de 1/160 a 1/320 e os mantiveram até o final do experimento (Figura 1).

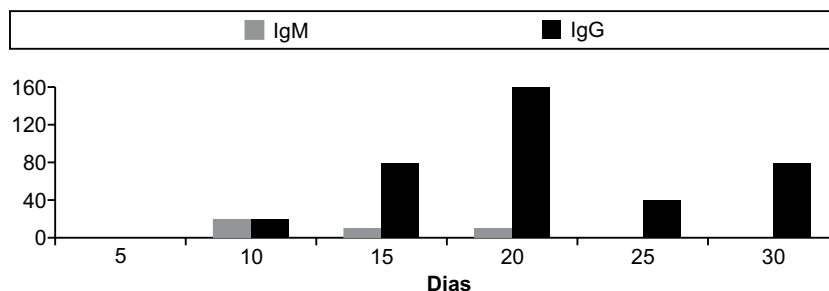


Figura 1. Detecção dos níveis de anticorpos (IgM e IgG), nos soros de camundongos não tratados, infectados com cepa cistogênica ME-49 de *T. gondii*, durante o período de 30 dias.

Os camundongos infectados e tratados, tanto do grupo A quanto do grupo B, apresentaram diminuição nos títulos (níveis de IgG) no decorrer do tempo (diminuição, em média, de dois títulos). As amostras provenientes dos animais tratados apresentaram diminuição significativa nos títulos de anticorpos – IgG – avaliados com os dois esquemas, pela reação de imunofluorescência indireta, em relação ao grupo controle. Entre os dois esquemas terapêuticos não houve diferenças significativas (Figura 2).

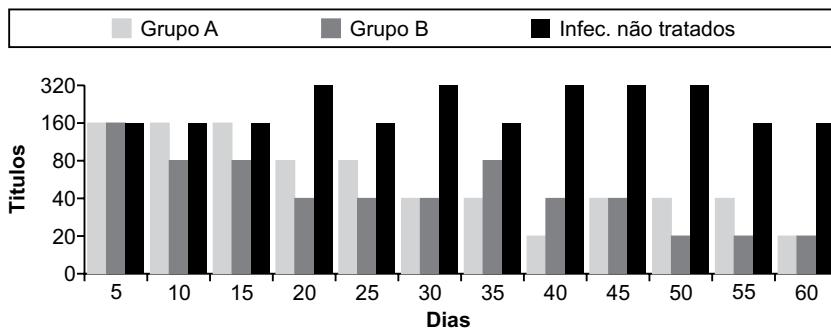


Figura 2. Perfil da Imunoglobulina da classe G (IgG), em um grupo de camundongos isogênicos infectados com a cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii* tratados com terapêutica específica, acompanhados por 60 dias, Grupo A tratado com pirimetamina + ácido fólico, Grupo B tratado com pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico, infectados e não tratados.

DISCUSSÃO

Diferenças na virulência de amostras de *T. gondii* têm sido relatadas em vários estudos com base na inoculação em animais de laboratório.

A detecção de anticorpos da classe IgM como primeira imunoglobulina efetora da resposta imune é descrita na esquistossomose (Kanamura et al., 1978) e em várias outras infecções, como toxoplasmose (Amato Neto, 1972) e doença de Chagas (Vattuone et al., 1973). Segundo Camargo (1996), qualquer título de anticorpo IgM traduz, geralmente, infecção recente, independentemente da existência ou não de títulos de anticorpos IgG. A cepa ME-49 de *T. gondii*, isolada originalmente da musculatura de carneiro, é uma cepa citogênica e considerada avirulenta ou de baixa virulência (Lunde & Jacobs, 1983). A curva sorológica da cepa ME-49 de *T. gondii*, antes e após o tratamento específico, demonstrou que, com o tratamento, há uma diminuição na produção de anticorpos IgG, provavelmente em virtude da diminuição de estímulo antigênico. Estudos terapêuticos utilizando a associação azitromicina-pirimetamina, em camundongos com toxoplasmose aguda, mostraram a eliminação dos parasitos do sangue e dos pulmões de camundongos infectados e redução da taxa de mortalidade. Esse resultado revelou proteção significativa dos animais tratados quando comparado com os controles

infectados e não tratados (Amato Neto et al., 1995), no entanto o autor não realizou o acompanhamento sorológico desses camundongos.

Os resultados do presente estudo indicam que tanto a pirimetamina quanto a sulfadiazina associada à pirimetamina promoveram um decréscimo na produção da imunoglobulina IgG entre os animais tratados. Isso se deu nos dois esquemas terapêuticos, comparando-se com os animais não tratados, portanto o tratamento demonstrou eficiência tanto na administração isolada quanto na associada. Bosch-Driesser et al. (2002) empregaram essa associação em pacientes com lesões oculares de toxoplasmose e obtiveram resultados semelhantes aos da associação pirimetamina-sulfadiazina com relação à eficácia, além de observarem menor incidência de efeitos colaterais. Embora já existam outros medicamentos com reconhecida atividade antitoxoplasma, como a clindamicina, o sulfametoxazol, o trimetoprim e a espirimicina, nenhum apresenta atividade contra os cistos do parasito. É, portanto, prioritária na terapêutica da toxoplasmose a descoberta de medicamentos que possam eliminar o microorganismo, particularmente em sua forma cística (Luft & Remington, 1992), para evitar recaídas da infecção. Vários trabalhos sobre a associação de medicamentos, como o citado acima, demonstram a eficácia da terapêutica sobre a parasitemia, mas a avaliação dos níveis de anticorpos não é citada. Nas infecções chagásicas crônicas, o tratamento não interfere rapidamente nos níveis de anticorpos (Cançado et al., 1976, Luquetti & Castro, 1997) e seu declínio vai ocorrendo ao longo do tempo. Isso, porém, não é o que, aparentemente, acontece com os resultados observados neste estudo.

O tratamento da gestante e do recém-nascido com toxoplasmose congênita pode prevenir ou atenuar a doença. Este estudo evidenciou a diminuição do estímulo antigênico após a terapêutica precoce da infecção toxoplásmica, o que pode originar outros trabalhos experimentais com estudos em camundongos inoculados com as cepas agressivas do tipo RH (tratados simultaneamente no início da infecção), que reproduzem de forma mais semelhante a infecção humana. Deve-se ressaltar a necessidade de pesquisas com tratamentos mais prolongados em camundongos infectados, de modo que seja ratificada sua negatividade sorológica e, conseqüentemente, a cura desta parasitose.

ABSTRACT

Serological profile of chronically infected mice with the cystogenic ME-49 strain of *Toxoplasma gondii* before and after specific treatment

This study evaluated the serological profile after experimental specific therapy of BALB / c mice infected with the cystogenic strain ME-49. Forty-five animals were inoculated individually, intraperitoneally with ten cysts of strain ME-49. Mice were divided into three groups of fifteen animals each, and a control group with five non-infected and non-treated animals. The infected animals and controls were simultaneously monitored daily for twenty days. After this period, they were divided into two groups: A and B and subjected to specific treatment regimens as follows:

group A: pyrimethamine plus folic acid, group B: pyrimethamine, folic acid and sulfadiazine for ten consecutive days. From the fifth day of treatment on, one mouse of each group was anesthetized and blood was collected by cardiac puncture; the serum was analyzed by the indirect immunofluorescence test. Treated animals showed a significant decrease in the titers of IgG antibodies, compared to the infected and untreated group. There was no significant difference among samples with different treatment regimes, showing that early treatment reduces rapidly the levels of IgG anti *T. gondii* and suggesting a possible cure of the infection.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*. Treatment. Cystogenic strain ME-49.

REFERENCIAS

1. Amato Neto V, Camargo ME, Mendonça JS, Levi GC, Oseka GW. Observações sobre a pesquisa de anticorpo IgM anti-toxoplasma por imunofluorescência no soro de pacientes com *Toxoplasma* adquirida, forma linfoglandular. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 14: 264-272, 1972.
2. Amato Neto V, Servolo MEA, Levi GC, Seixas DMI. *Toxoplasmose*. 4.ed. Sarvier, São Paulo, 1995. p. 250.
3. Bosch-Driessen L, Verbraak F, Suttrop-Schulten M, Van Ruyven, Klok Am, Hoyng C, Rothova A. A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalm* 134: 34-40, 2002.
4. Camargo ME. Toxoplasmosis. In: Ferreira AW, Avila SLM. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996. p. 165-174.
5. Cançado JR, Salgado AA, Batista SM, Chiari CA. Segundo ensaio terapêutico com nifurtimox na Doença de Chagas. *Rev Goiana Med* 22: 203-233, 1976.
6. Desmonts G, Gouvrer J. Congenital Toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *New Engl J Med* 290: 1110-1116, 1974.
7. Frenkel JK. Toxoplasma in and around us. *Bioscience* 23: 343-352, 1973.
8. Frenkel JK, Nelson BM, Arias-Stella J. Immunossuppression and toxoplasmic encephalitis: clinical and experimental aspects. *Human Pathol* 6: 97-111, 1975.
9. Foulon W, Naessens A, Derde MP. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Prenatal* 11: 57-62, 1994.
10. Hohlfield P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, MacAleese J, Descombey D, Forestier F. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after *in utero* treatment. *J Pediatr* 115: 765-769, 1990.
11. Kanamura HY, Hoshino-Shimizu S, Silva LC. Pattern of class-specific fluorescent antibodies according to the stage of the infection in human *Schistosomiasis mansonii*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 20: 76-78, 1978.
12. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15: 211-222, 1992.
13. Lunde MN, Jacobs L. Antigenic Differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 69: 806-808, 1983.
14. Luquetti AO, Castro A. M. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. In: Dias JCP, Coura JR. (eds). *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas*. Um Manual para o Clínico Geral Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p. 99-114.
15. Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du *gondii*. *Comptes Rendus de l'Academie des sciences (Paris)* 148: 369-372, 1909.
16. Remington JS. Toxoplasmosis and congenital infection. *National Foundation of the march of dimes*. 4: 47-56, 1968.
17. Ruskin J, Remington JS. Toxoplasmosis in the compromised host *Ann Intern Med* 84: 193-199, 1976.
18. Vattuone NH, Szarfman A, Gonzales-Cappa SM. Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' Disease). *J Trop Med Hyg* 76: 45-47, 1973.