

MARCOS GONTIJO DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA
TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E ANÁLISE
HISTOPATOLÓGICA ENCEFÁLICA EXPERIMENTAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação do INSTITUTO DE PATOLOGIA
TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA da
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, como
pré-requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Tropical.

GOIÂNIA – 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCOS GONTIJO DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA
TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E ANÁLISE
HISTOPATOLÓGICA ENCEFÁLICA EXPERIMENTAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação do INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA da UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Essa pesquisa contou com o apoio financeiro do Sistema Único de Saúde através das Secretarias Municipal e Estadual de Saúde do Estado de Goiás, pelo **“Programa de Controle da Transmissão Vertical da Toxoplasmose”**, em ação conjunta da Universidade Federal de Goiás (UFG) com o SUS.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a **Ana Maria de Castro**

Co-Orientadora: Prof^ª Dr.^a **Joana Darc A. Herzog Soares**

GOIÂNIA – 2006

DEDICATÓRIA

A Deus que me deu tudo que tenho, amigos maravilhosos, família e perseverança para a execução deste trabalho.

Aos meus pais que foram e são o maior exemplo de humildade e honestidade que se pode imaginar e dos quais espero ter herdado essas características.

A minha esposa Érica Eugênio Loureço pelo apoio incondicional em tudo que faço.

A todos os meus queridos e estimados amigos que estiveram e estão ao meu lado em todos os momentos, desde a árdua rotina da pesquisa até os momentos de descontração com quem compartilho as vitórias e derrotas da vida.

AGRADECIMENTOS

A estimada Prof^ª. Dr.^a Ana Maria de Castro, orientadora deste trabalho, pelo exemplo de ética e esforço na sua profissão e carinho com que me recebeu e mantém até hoje, ao qual eu serei eternamente grato.

A minha querida amiga mestranda Tatiane Luiza da Costa por participar ativamente de todas as etapas da execução desse trabalho, desde a parte de planejamento, execução e interpretação dos resultados. Além disso, por compartilhar e participar das angustias e alegrias durante esse período.

A minha querida amiga Nair Marques Martins técnica do laboratório de pesquisa que me ensinou todos os procedimentos realizados nesse trabalho e pela ajuda preciosa na execução dos experimentos.

Aos queridos amigos mestrados Eduardo e Fabiana por sua amizade e companhia durante essa caminhada.

Ao estimado amigo doutorando Edson Sidião, pela ajuda na adaptação ao Instituto e por ser um exemplo que procuro seguir.

A Prof^ª. Dr.^a Joanna Darc A Herzog Soares pela enorme contribuição no desenvolvimento dessa pesquisa como co-orientadora.

A Prof^ª. Dr.^a Mariza Martins Avelino, Prof^º. Waldemar Naves Amaral e mestranda Maria Bárbara Franco Gomes, pelo fornecimento dos materiais biológicos de seus pacientes para a execução desse trabalho.

Ao Prof^o Dr.^o Ruy Sousa Lino Júnior pela contribuição e participação direta na pesquisa, além do exemplo de perfeccionismo e ética.

As minha queridas amigas mestrandas, Juliana, Josy, Sueli, Cirlane, Marina, Ana Paula e Aline, pela amizade que criamos, e que espero cultivar durante a minha vida.

Ao querido e estimado Prof^o Dr.^o José Clecildo, pela amizade e otimismo que transmite às pessoas que estão ao seu lado, e do qual eu sou e sempre serei um profundo admirador.

Ao amigo e respeitável Prof^o Dr.^o Marco Túlio Garcia Zapata, pela contribuição na minha formação acadêmica, pelos sábios e valorosos conselhos.

Aos meus primos Rodrigo e Júnior pelo incentivo e apoio, que sempre me motivaram a fazer o melhor possível.

Aos filhos das gestantes agudamente infectados pelo *Toxoplasma gondii*, sem os quais essa pesquisa não teria sido possível.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente na execução dessa pesquisa.

Às secretarias Estadual e Municipal de Saúde pelo financiamento desta pesquisa, via SUS.

SUMÁRIO

	Página
Resumo-----	VIII
Abstract-----	X
Lista de abreviaturas-----	XII
Lista de Figuras e Tabelas-----	XIV
1 – INTRODUÇÃO-----	1
1.1 - Apresentação-----	1
1.2 – Justificativa-----	1
1.3 - Objetivos-----	4
1.3.1 – Geral-----	4
1.3.2 – Específico-----	4
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	5
2.1 – Histórico-----	5
2.2 – Etiologia-----	6
2.3 - Epidemiologia da toxoplasmose-----	9
2.3.1 - Prevalência da toxoplasmose em gestantes-----	9
2.3.2 - Transmissão materno-fetal-----	10
2.3.3 - Manifestações clínicas da toxoplasmose na gestante e no recém-nascido-----	11
2.4 - Diagnóstico da toxoplasmose-----	13
2.4.1 - Diagnóstico Parasitológico da toxoplasmose-----	13
2.4.2 - Diagnóstico sorológico da toxoplasmose-----	16
2.4.3 - Diagnóstico na gestante e no feto-----	18
2.4.4 - Diagnóstico no recém-nascido-----	20
2.5 – Tratamento-----	22
2.5.1 - Tratamento da gestante com toxoplasmose aguda-----	22
2.6 – Medidas profiláticas-----	23

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS -----	24
3.1 – Pacientes-----	24
3.2 - Processamento do material-----	26
3.3 - Acompanhamento dos camundongos-----	26
3.3.1 - Punção Cardíaca-----	27
3.4 - Imunofluorescência indireta em soro de camundongo-----	27
3.5 - Análise histopatológica do encéfalo dos camundongos-----	28
3.5.1 - Processamento histológico-----	28
4 – RESULTADOS -----	29
4.1 – 1º Artigo: Otimização do diagnóstico parasitológico da Toxoplasmose congênita. -----	30
4.2 – 2º Artigo: Estudo anatomopatológico em encéfalos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com <i>T. gondii</i> -----	44
5 - CONCLUSÕES GERAIS -----	61
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	62
7 – ANEXOS -----	72
7.1 – ANEXO I - Instruções aos autores para publicação dos artigos nas revistas---	72
7.2.-. ANEXO II - Carta do comitê de ética-----	72

RESUMO

A toxoplasmose aguda na gestante é de relevante importância em nosso meio, por sua elevada incidência e pelo fato de poder resultar em graves seqüelas para o produto conceptual infectado. Por isso, é de fundamental importância o diagnóstico precoce da infecção fetal, pois a medicação utilizada na gestante e/ou recém-nascido, pode mudar o sombrio prognóstico dessa infecção. Por outro lado, existe muita dificuldade no diagnóstico precoce da infecção fetal, devido à vários fatores fisiológicos como imaturidade do sistema imune, dificuldade de formação de anticorpo pelo feto em função dos elevados títulos maternos de IgG que atravessam a barreira placentária, causando problemas na interpretação da quantificação da IgG. Por isso é que os métodos de identificação do parasito tornam-se essenciais no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. O exame de inoculação em camundongos possui 100% de especificidade, mas a sua sensibilidade é baixa, seu custo é elevado e a sua técnica é difícil e necessita de 120 dias para a liberação dos resultados. Por este motivo, um exame que possa identificar a presença do parasito no material biológico analisado, que seja de mais fácil execução e de resultados mais rápidos, torna-se necessário na tentativa de substituir a técnica de amplificação do DNA do parasito, por ser de custo muito elevado.

Este estudo teve como objetivos, a otimização dos resultados parasitológicos, através da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* no soro dos camundongos inoculados por material biológico de grávidas, fetos e/ou recém-nascidos e análise das alterações histopatológicas provocadas pelo agente nos encéfalos dos camundongos. Os materiais biológicos provenientes dos fetos foram coletados por cordocentese (sangue fetal) e amniocentese (líquido amniótico) e de grávidas e seus recém nascidos, foram provenientes de sangue periférico e líquido cefalorraquidiano.

As 138 amostras foram encaminhadas dos serviços de referência do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás e do Hospital Materno Infantil, participantes do projeto de **“Controle de Toxoplasmose Vertical da toxoplasmose no Estado de Goiás”**. Essas foram processadas e inoculadas camundongos BALB/c, acompanhados por 60 dias e sacrificados. Seus encéfalos foram macerados e repicados em outros camundongos, que

após 60 dias, também foram sacrificados. Do sangue desses, foi realizada sorologia pela técnica de imunofluorescência Indireta, à procura de anticorpos antiToxoplasma das classes IgG e IgM. No encéfalo, foram realizados cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina, à procura do parasito e de alterações causadas pela presença do mesmo. O *T. gondii* foi demonstrado no lavado peritoneal dos camundongos em cinco amostras, sendo três de sangue fetal e duas de líquido amniótico. Já a histopatologia do encéfalo demonstrou alterações em 45 amostras e IFI experimental detectou anticorpos antiToxoplasma em 67 amostras. A análise histopatológica dos encéfalos demonstrou que em 82,4% dos casos havia inflamação e em 64,7%, necrose coagulativa. Foi possível observar que a sorologia por IFI em camundongos, além de ser mais sensível que a histopatologia e a inoculação, utiliza menor número de animais e a liberação dos resultados é feita na metade do tempo da inoculação, provando ser mais indicada.

ABSTRACT

Toxoplasmosis acute in the pregnant woman is of excellent importance in our way, for its raised incidence and the fact to be able to result in serious sequels for the infected conceptual product. Therefore, it is of basic importance the precocious diagnosis of the fetal infection, therefore the medication used in the just-born gestante and/or, can change the shady prognostic of this infection. On the other hand, much difficulty in the precocious diagnosis of the fetal infection exists, due to some physiological factors as immaturity of the immune system, difficulty of formation of antibody for the embryo in function of the raised maternal headings of IgG that cross the placenta barrier, causing problems in the interpretation of the quantification of the IgG. Therefore it is that the methods of identification of the parasite become essential in the precocious diagnosis of toxoplasmosis congenital. The examination of inoculation in mice possess 100% of especificidade, but its sensitivity is low, its cost is raised and its technique is difficult and needs 120 days for the release of the results. For this reason, an examination that it can identify the presence of the parasite in the analyzed biological material, that is of more easy execution and faster results, becomes necessary in the attempt to substitute the technique of amplification of the DNA of the parasite, for being of cost very raised. This study it had as objective, the improvement of the parasitological results, through the research of antibodies anti-*T. gondii* in the serum of the mice inoculated for removed biological material of embryos and/or just-born and analyzed histopatologic alterations provoked by the agent in the encephalon of the mice. The biological materials proceeding from the embryos had been collected by cordocentesis (fetus blood) and amniocentesis (liquid amniotic) and of just been born, they had been proceeding from peripheral blood and liquid cerebral.

The 138 samples had been directed of the services of reference of the Hospital of the Clinics of the Federal University of Goiás and the Infantile Maternal Hospital, participant of the project of "Control of Vertical Toxoplasmosis of toxoplasmosis in the State of Goiás". These processed and had been inoculated BALB/c mice, folloied per 60 days and sacrificed. Its encephalon had been macerated and repicads in other mice, that after 60dias, had been also sacrificed. Of the blood of these, serologic for the technique of

Indirect immunofluorescence was carried through, to the search of antibodies antiToxoplasma of the classrooms IgG and IgM. In encephalon, had been carried through histologic cuts bluish by hematoxiline-eosine, to the search of the parasite and of alterations caused for the presence of exactly. The *T. gondii* was demonstrated in the peritonium washed one of the mice in five samples, being three of fetus al blood and two of amniotic liquid. Already the histopatologic of encephalon demonstrated alterations in 45 samples and experimental IFI detected antibodies antiToxoplasma in 67 samples. The histopatologic analysis of the encephalon demonstrated that in 82,4% of the cases it had inflammation and in 64,7%, necrosis. It was possible to observe that the serologic for IFI in mice, besides being more sensible than the histopatologic and the inoculation, uses minor number of animals and the release of the results is made in the half of the time of the inoculation, proving more to be indicated.

LISTA DE ABREVIATURAS

CN – controle negativo

DS-ELISA – Ensaio Imunoenzimático com Duplo Sanduíche

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

E - Edema

ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

HC-UFG – Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás

HE – Hematoxilina-Eosina

HISTO – Histopatologia

HMM – Hemorragia na Meninge

HMP – Hemorragia no Parênquima

HPM - Hiperemia na Meninge

HPP – Hiperemia no Parênquima

I – Inflamação

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IH - Imunohistoquímica

INOC – Inóculo

IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

ISAGA - Reação de Aglutinação por Imunoabsorção de IgM

LA – Líquido Amniótico

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

NC – Necrose Coagulativa

PAP - Peroxidase-Antiperoxidase

PBS - Solução Salina Tamponada

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

RN – Recém Nascido

rpm – Rotações por Minuto

SgF – Sangue Fetal

SgRN – Sangue de Recém Nascido

SNC – Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** – Ciclo do *Toxoplasma gondii*.-----Pág. 8
- Figura 2** – Esquema da coleta de líquido amniótico por amniocentese.-----Pág. 25
- Figura 3** – Esquema da coleta de sangue fetal por cordocentese. -----Pág. 25
- Foto 1** - Formas Taquizoítas----- Pág. 49
- Foto 2** - Pseudocisto----- Pág. 49
- Foto 3** - Cisto----- Pág. 49
- Foto 4** – A - Edema perivascular, B - formas taquizoítas ----- Pág. 51
- Foto 5** – A - Hiperemia no Parênquima, B - formas taquizoítas ----- Pág. 51
- Foto 6** – Hemorragia no parênquima----- Pág. 51
- Foto 7** – A - Hiperemia na meninge, B - hemorragia na meninge----- Pág. 51
- Foto 8** – A - Necrose coagulativa , B - inflamação----- Pág. 51
- Foto 9** – A - Necrose coagulativa, B - inflamação----- Pág. 51

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - APRESENTAÇÃO

Essa dissertação avalia dois métodos de otimização parasitológica: a histopatologia de encéfalo de camundongos e a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM, pela técnica de IFI, no sangue de camundongos inoculados com material biológico proveniente de coletas fetais através de cordocentese (sangue fetal) e amniocentese (líquido amniótico) e amostras de sangue periférico e líquido cefalorraquidiano de recém-nascidos suspeitos ou já comprovadamente infectados “in útero”, pelo *Toxoplasma gondii*.

No primeiro artigo os resultados obtidos com a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM no sangue dos camundongos inoculados com material biológico, mostraram 50,4% (67/133) de positividade parasitária. Esse estudo teve a finalidade de otimizar os resultados parasitológicos quando se compara com a inoculação intraperitoneal em camundongos, onde o isolamento do *T. gondii* exige um alto custo, e resultados demorados.

No segundo artigo, foi realizado estudo anatomopatológico em 51 encéfalos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com material positivo pela histopatologia. As alterações encontradas apresentaram grande polimorfismo, onde o edema foi a alteração mais encontrada (100% dos casos), a inflamação em 82,4% e a necrose em 64,7%. Esse estudo corrobora os achados da literatura que incriminam o *T. gondii* como causador de graves danos neurológicos em seus hospedeiros.

1.2 - JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita pode ser prevenida durante a gestação através de um acompanhamento pré-natal adequado, com o qual se faz possível o diagnóstico precoce da infecção materna pelo *T. gondii*. Essa é de relevante importância em nosso meio, pela elevadíssima incidência de 8,9% (Avelino et al. 2003).

O diagnóstico precoce assim como o tratamento antiparasitário adequado da mãe tem demonstrado ser capaz de reduzir a taxa de transmissão para o feto e também a gravidade das seqüelas nos casos em que a infecção intra-uterina já ocorreu (Hohlfeld et al. 1989, Foulon et al. 1994). A taxa de transmissão materno-fetal varia principalmente de acordo com a idade gestacional no momento da infecção materna. Quando essa ocorre antes da décima quinta semana de gestação, pode resultar numa taxa de transmissão menor do que 5% podendo atingir 80%, se próximo do termo (Foulon et al. 1999), mas o acompanhamento sorológico materno sistemático durante a gestação permite apenas uma estimativa indireta do risco de infecção fetal (Remington et al. 1995).

A transmissão transplacentária é significativa porque o feto é um organismo frágil do ponto de vista imune, tanto nos mecanismos de defesa inespecíficos quanto nos específicos. Ademais, a transmissão passiva de IgG da mãe para proteger o filho só atinge níveis eficazes após na 20-22ª semanas de gestação, o que faz com que as repercussões fetais variem em gravidade e dependam da intensidade da deficiência imunológica. Em consequência da incapacidade imunológica de defesa do organismo fetal, os acometidos intra-útero podem ter manifestações da doença com características de infecção aguda, sub-aguda ou crônica, dependendo da fase da gestação em que a infecção ocorreu (Naspitz 1985, Ceccon 1997).

A toxoplasmose pode se manifestar clinicamente de diversas maneiras; porém, caracteristicamente, é assintomática ou oligossintomática nos pacientes imunocompetentes. Quando atinge os imunocomprometidos determina quadros graves e se infecta a gestante, pode ocasionar danos importantes ao conceito (Nogueira 1996). Habitualmente, a toxoplasmose se transmite ao feto durante a primo-infecção materna, no entanto, há relatos de toxoplasmose em duas gestações sucessivas com encontro do *T. gondii* na placenta e nos fetos. Outro autor também descreve a transmissão congênita em filhos de mulheres que tiveram a infecção antes da concepção (Pons 1995). Além disso, a toxoplasmose é implicada como causa de abortamento de repetição (Gomes 1978).

O espectro clínico da infecção congênita pelo *T. gondii* varia de alterações aparentes ao nascimento, com morbimortalidade perinatal elevada (microcefalia, crescimento intra-uterino retardado, hidrocefalia), a uma infecção subclínica com possibilidade de risco para o desenvolvimento de coriorretinite e/ou complicações tardias

na vida futura (Wilson et al. 1980, Koppe et al. 1986, McAuley et al. 1994). Por outro lado, a maturidade é um fator importante de resistência natural contra o parasito, pois geralmente ocorre uma infecção assintomática nas mães gestantes e sintomáticas (ao longo do tempo) nos seus filhos. A fim de providenciar tratamento apropriado para todas as crianças com risco de embriopatia pelo *Toxoplasma*, o diagnóstico definitivo da infecção congênita é obrigatório e deve ser prontamente realizado (Remington et al. 1995, Lebech et al. 1996).

Na maioria dos casos, a sorologia representa a base do diagnóstico e do controle da toxoplasmose. A presença de anticorpos específicos permite diagnosticar uma infecção por *T. gondii*. Anticorpos específicos das classes IgM, IgA, IgE e IgG são produzidos em resposta à infecção pelo *T. gondii*, sendo que as IgM, IgA e IgE aparecem antes da IgG, porém, na maioria dos indivíduos, duram até seis meses e a IgG, na forma adquirida, permanece por toda a vida (Grover 1990, Cazanave 1993).

Assim as técnicas sorológicas utilizadas na rotina laboratorial têm sensibilidade satisfatória em grávidas (Denmark & Chessum 1978, Sounis 1979, Camargo 1995). Um fator preocupante é que em fetos e recém nascidos essas técnicas são imprecisas devido à imaturidade imunológica do feto e/ou recém-nascidos (RN), a interferências de anticorpos de classe IgG de origem transplacentária que interferem na produção de anticorpos fetais e dificuldades na interpretação da quantificação da IgG (pela confusão com a IgG materna) sendo necessárias assim, técnicas parasitológicas que evidenciem com precisão a transmissão congênita (Avelino et al. 2003).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica com boa sensibilidade e especificidade, porem seu uso ainda não está disponível no âmbito da rotina. O inóculo em camundongos é uma prática laboratorial largamente utilizada como complemento ao diagnóstico sorológico em fetos e RNs, porem apesar de 100% de especificidade possui baixa sensibilidade e necessita de longo tempo para a resposta laboratorial desejada, além de necessitar de acompanhamento técnico e um número grande de animais em cada experimento. Por esse motivo torna-se necessária a análise de outros métodos, que permitam determinar a presença da infecção protozoótica em camundongos infectados por materiais biológicos oriundo de fetos e/ou de recém-nascidos. Essas dificuldades motivaram esse estudo.

1.3 - OBJETIVOS

1.3.1 – GERAL

Otimizar técnicas parasitológicas para a confirmação do diagnóstico da transmissão vertical de toxoplasmose, em grávidas, fetos e recém nascidos de grávidas em situação de risco (reagudização, ou primo-infecção) atendidas pelo serviço de obstetrícia e pediatria do Hospital das Clínicas/HC-UFG em Goiânia-GO.

1.3.2 – ESPECÍFICOS

ARTIGO 1

1 – Otimizar o diagnóstico precoce de infecção aguda por demonstração do parasito, obtido através da inoculação de material biológico em camundongos BALB/c.

2 – Avaliar a utilização da soroconversão precoce nos camundongos, como indicador de presença de parasitos no material inoculado e conseqüentemente, confirmação de infecção ativa.

ARTIGO 2

3 – Analisar a sensibilidade da histopatologia, na detecção de *Toxoplasma gondii* em cortes histológicos de encéfalo dos camundongos inoculados, corados por HE.

4 - Analisar semiquantitativamente as lesões provocadas pelos parasitos no encéfalo dos camundongos infectados experimentalmente.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - HISTÓRICO

O *T. gondii*, agente responsável pela toxoplasmose, foi reconhecido provavelmente pela primeira vez no Brasil, em São Paulo, por Alfonso Splendore em julho de 1908. Este pesquisador de origem italiana e radicado no Brasil, ao trabalhar com coelhos em seu laboratório, observou uma doença cujo quadro anátomopatológico era semelhante à leishmaniose visceral humana. Apresentou uma descrição completa das lesões patológicas e dos corpúsculos parasitários presentes na forma livre e intracelular, isolados e agrupados, em diversos tecidos de animais infectados. Em 26 de outubro de 1908, Nicolle e Manceaux do Instituto Pasteur de Tunis descreveram um microrganismo semelhante àquele observado por Splendore, em células monocelulares do baço e do fígado de um roedor norte-africano, o *Ctenodactylus gondii*.

O oftalmologista Jankü (1923) em Praga fez a primeira descrição de toxoplasmose congênita no ser humano, em uma criança falecida aos 11 meses de idade com hidrocefalia e cegueira, cuja necrópsia, em cortes do globo ocular direito, evidenciou a presença de parasitos na retina.

Nos Estados Unidos da América Wolf et al (1939) descreveram um caso fatal de um lactente com encefalite granulomatosa. Também realizaram a primeira transmissão experimental de toxoplasmose humana para animais, tendo ainda demonstrado um agente infeccioso produzindo doença intra-uterina. A descoberta do *T. gondii*, como causa de doença adquirida no adulto, é creditada a Pinkerton & Weinman (1940), que descreveram um caso de doença fatal generalizada em um jovem.

Sabin & Feldman (1948) criaram o teste do corante de Sabin-Feldman, permitindo que inúmeros investigadores estudassem os aspectos clínicos e epidemiológicos da toxoplasmose, demonstrando ser uma doença de alta prevalência em todo o mundo e assintomática na maioria dos pacientes.

Hutshison (1965) foi o primeiro a reconhecer o papel do gato no ciclo evolutivo do parasito, mostrando que esses animais poderiam eliminá-lo pelas fezes. A verdadeira natureza do parasito permaneceu um mistério até que Frenkel et al. (1970) descreveram a sua fase sexuada no intestino delgado do gato doméstico, produzindo cistos típicos dos coccídios, nas fezes.

Nas últimas décadas extraordinários avanços foram conseguidos, como a descrição de diversos métodos sorológicos. Além disso, conquistas recentes na imunologia e na biologia molecular e celular têm permitido um melhor diagnóstico da parasitose, bem como novos progressos na assistência de grávidas, crianças e indivíduos imunocomprometidos.

2.2 - ETIOLOGIA

O *T. gondii* apresenta-se na natureza sob três formas: - o oocisto, responsável pela produção de esporozoítos; - a forma proliferativa ou taquizoíta; - a forma cística, denominada bradizoíta (Dubey et al. 1998).

Os oocistos são excretados nas fezes dos felinos, que são os hospedeiros definitivos e através da ingestão, infectam o hospedeiro intermediário (FIGURA 1). Os oocistos são formados por esquizogonia e gametogonia ao longo do intestino delgado dos felídeos. Nos gatos, o período até a produção de oocistos varia de 3 a 10 dias quando ocorre a ingestão de cistos teciduais; de 19 a 48 dias após a ingestão de taquizoítas e de 21 a 40 dias após a ingestão de oocistos. O gato pode excretar até milhões de oocistos nas fezes por período de 7 a 20 dias. Após ser excretado, o oocisto sofre processo de esporulação no máximo até cinco dias, tornando-se infectante e permanecendo viável por até um ano em solo úmido e quente. O oocisto é inicialmente esférico, tornando-se ovalado após sofrer processo de esporulação em temperatura entre 4°C e 37°C (Dubey et al. 1970).

A forma de taquizoíta requer um hábitat intracelular para se multiplicar e sobreviver, sendo rapidamente destruída no suco gástrico (Jacobs et al. 1960). Sua reprodução dentro das células do hospedeiro ocorre por endodiogenia, um processo de brotamento interno em que duas células-filhas são formadas dentro da célula-mãe, sendo então liberadas após ruptura. A forma de taquizoíta é encontrada no estágio agudo da infecção, invadindo todos

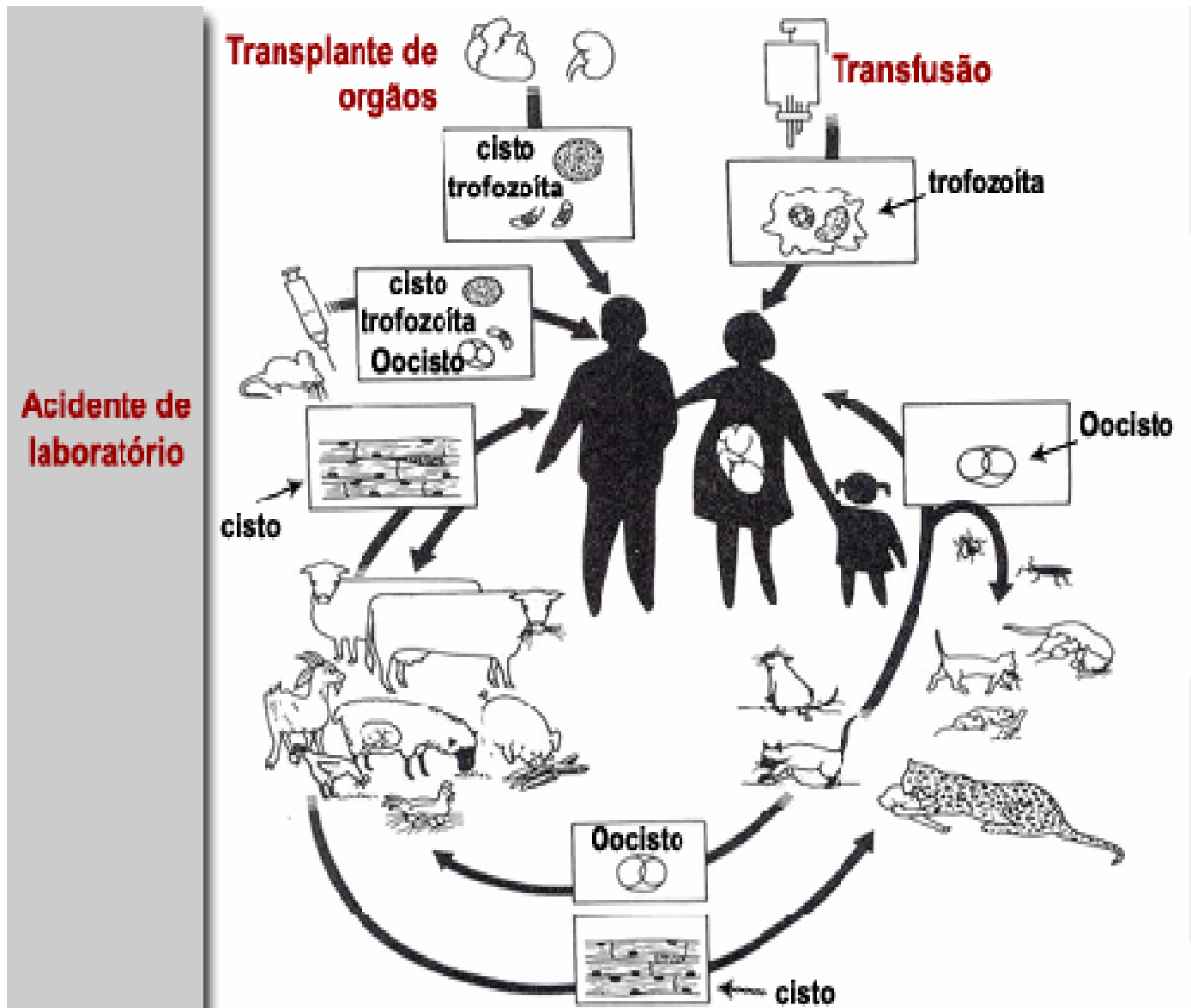
os tipos de células. Após a invasão das células do hospedeiro, os microorganismos se multiplicam rapidamente nos seus vacúolos, formando rosetas. O citoplasma torna-se repleto de taquizoítas a ponto de se romper e provocar a liberação desses, que invadem células contíguas ou são fagocitados (FIGURA 1).

Colônias de pseudocistos, contendo taquizoítas produzidos por endodiogenia podem permanecer nas células do hospedeiro por período prolongado, sem haver a formação de um cisto verdadeiro (Frenkel 1973).

A terceira forma do *T. gondii*, o cisto tecidual, é formado na célula do hospedeiro e pode variar no seu tamanho. Contém bradizoítas e constitui-se na forma de resistência do parasito nos tecidos, podendo persistir viável pelo resto da vida do hospedeiro (Dubey & Frenkel 1976). Podem estar presentes em todos os tecidos, porém os principais sítios de infecção latente ocorrem em miocárdio, encéfalo e tecido músculo-esquelético (Remington & Cavanaugh 1965). A parede do cisto pode ser rompida pela pepsina ou tripsina, sendo que os bradizoítas liberados permanecem viáveis por até duas horas em meio contendo ácido clorídrico e pepsina, ou até seis horas, em meio contendo tripsina, permitindo sobreviverem ao período de digestão normal no estômago e no duodeno. O congelamento abaixo de 20°C negativos e o aquecimento acima de 66°C destroem a forma cística do parasito, entretanto em temperatura de 4°C, este pode sobreviver por até dois meses (Jacobs et al. 1960) Um aspecto importante do cisto é uma possível reativação da infecção, causada pela liberação de bradizoítas, que se transformam em taquizoítas e promovem uma nova infecção aguda local (Frenkel et al. 1975). Hofflin & Remington (1985) observaram que a reativação também pode ocorrer à distância, como na presença de múltiplas lesões de encefalite em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

FIGURA 1.

CICLO BIOLÓGICO DO *Toxoplasma gondii*



2.3 - EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

2.3.1 PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM GESTANTES

A prevalência da infecção toxoplásmica em adultos varia consideravelmente de acordo com a idade e a população estudada (Feldman & Miller 1956). Esta variação pode ser explicada pela diferença de exposição às duas principais fontes de infecção: os cistos teciduais presentes na carne de animais, e os oocistos, disponíveis em solo contaminado por fezes de gatos. A elevada prevalência da infecção encontrada na França relaciona-se ao freqüente hábito de ingestão de carne crua ou mal cozida (Desmonts et al. 1965). Nos Estados Unidos da América, a prevalência atinge de 10% a 50%, enquanto que na Austrália é de 4%, na Finlândia - 20%, Polônia - 36%, Áustria - 37%, Itália - 40%, Etiópia - 48%, Bélgica - 53%, Panamá - 63%, França - 71% e El Salvador - 75% (McCabe & Remington 1988, Aspöck & Pollack 1992, Roos et al. 1993). Na década de 60 em investigação realizada em Belo Horizonte por Araújo (1970) em soros de adultos revelou 50% de positividade à reação de Sabin-Feldman. No final da década de oitenta, Vaz et al. (1990) encontraram em gestantes, ao primeiro atendimento em centro de saúde da área metropolitana de São Paulo, soropositividade de 67%. Já na década de noventa, várias investigações foram publicadas. Na cidade de Porto Alegre, estudo coordenado por Neves et al (1994), em gestantes, encontrou soropositividade para toxoplasmose em 54%. Também a pesquisa conduzida por Inagaki (1997) no serviço de pré-natal em maternidade pública de São Paulo demonstrou a prevalência de anticorpos específicos para toxoplasmose em 65% em um grupo de gestantes. Em Belém, estudo feito no Instituto Evandro Chagas por Carmo et al. (1997) em grávidas, revelou que 71% eram soropositivas. Outra pesquisa realizada por Brisighelli (1998) em gestantes, na cidade de Bragança Paulista no Estado de São Paulo, constatou soroprevalência de 55%. Nóbrega (1998), em Recife, ao estudar grávidas, encontrou o valor de 69%. Bichara (2001), em estudo desenvolvido no ambulatório do Programa de Toxoplasmose do Instituto Evandro Chagas com gestantes procedentes da área metropolitana de Belém, detectou prevalência de 81%.

Em Goiânia, a prevalência tem se mantido estável nos últimos 20 anos, em torno de 65% (Avelino. 2000).

Portanto, no Brasil, os diversos inquéritos epidemiológicos realizados em gestantes com diferentes testes sorológicos têm mostrado uma alta prevalência da toxoplasmose, que varia ao redor de 55% a 70%. Daí infere-se que de 30% a 45% das mulheres em idade fértil não apresentam anticorpos específicos para a doença com risco de contraí-la na gestação e transmiti-la ao concepto.

2.3.2. TRANSMISSÃO MATERNO-FETAL

A transmissão materno-fetal ocorre quando os taquizoítos, presentes na circulação materna, atingem a placenta e são transmitidos ao concepto. Desta forma, assume-se que a transmissão congênita ocorre geralmente durante a primo-infecção materna, embora existam relatos de que possa acontecer também durante a fase crônica da infecção (Frenkel 2002). Wilson & Remington (1980) afirmaram que a chance de transmissão materno-fetal depende de três fatores presentes conjuntamente: parasitemia materna inicial ou recorrente, maturidade da placenta e competência da resposta imunológica materna ao *T. gondii* classificada em completa, deficiente ou ausente.

A transmissão do *T. gondii* da mãe para o feto é variável, sendo que a média varia entre 30% a 40% dos casos e depende da idade gestacional em que acontece a infecção aguda na mãe (Desmonts et al. 1985, Wirlden et al. 1999, Santana et al. 2003, Figueiro-Filho et al. 2005).

Considerando-se que a toxoplasmose congênita é sintomática em apenas 10% dos pacientes, torna-se muito difícil determinar sua real incidência em países que não realizam o acompanhamento sorológico sistemático durante a gestação (Hall 1992). Difere entre as várias populações: nos Estados Unidos da América varia de 0,5 a 1/1.000 nascidos vivos (McCabe & Remington 1988); em Paris é de 3/1.000 nativos (Desmonts et al. 1965); na Finlândia é de 4,4/1000 nativos; de 5/1000 na Austrália; de 7,5/1000 na Alemanha e de 14,3/1000 na Bélgica (Lappalainen et al. 1992).

No Brasil, Castilho (1976) estimou a incidência de toxoplasmose congênita na cidade de São Paulo, durante o ano de 1970 e calculou o valor de 16 casos para 1.000 nascidos vivos, independentemente da presença de manifestações clínicas. No Rio de Janeiro, Coutinho et al. (1983) ao estudar em recém-nascidos constataram uma incidência de 1,4 para 1.000 nativos. Em outro estudo realizado na cidade de São Paulo, Pedreira (1995) analisou os casos sintomáticos ocorridos no período de um ano em uma Unidade Neonatal de hospital público universitário e encontrou uma incidência de 2 em 1.000 nascidos vivos. Em Brasília estima-se o nascimento de 18/1000 e em Goiânia 34/1000 (Avelino 2000).

A partir dessas considerações, é possível que ao redor de 3.000 a 6.000 neonatos sejam acometidos com a doença, anualmente no país. Assim, é necessário o conhecimento do diagnóstico clínico-laboratorial da toxoplasmose durante a gestação (Avelino 2000).

2.3.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA TOXOPLASMOSE NA GESTANTE E NO RECÉM-NASCIDO

Os sintomas da toxoplasmose aguda em mulheres gestantes podem ser transitórios e inespecíficos. Quando estão presentes, no máximo em 10% dos casos, geralmente limitam-se a linfadenopatia e à fadiga. A adenopatia pode persistir durante meses e comprometer apenas um único linfonodo. Menos freqüentemente, tem sido descrita uma síndrome do tipo mononucleose caracterizada por febre, mal-estar, faringite, cefaléia, mialgia e linfocitose atípica (Wong & Remington 1994).

A toxoplasmose tem sido responsabilizada por óbito intra-uterino. É possível que a infecção, quando aguda, cause óbito fetal no primeiro trimestre da gravidez (Desmonts & Couvreur et al. 1974). Entretanto, esta ocorrência em pacientes com infecção crônica é rara e não significativa (Remington et al. 2001).

Os recém-nascidos com toxoplasmose congênita podem apresentar um dos quatro padrões: Doença manifesta no período neonatal; Doença sintomática nos primeiros meses da vida; Seqüela ou reativação de uma infecção prévia não diagnosticada; Infecção subclínica.

A infecção que se manifesta no período neonatal é caracterizada pela tríade clássica composta por dilatação dos ventrículos cerebrais, calcificações intracranianas e retinocoroidite bilateral. No entanto, estes achados estão presentes em apenas 10% dos recém-nascidos. Com finalidade didática pode-se dividir as formas graves em neurológica e generalizada podendo apresentar os seguintes sintomas (retinocoroidite, alterações liquóricas, convulsões e calcificações cerebrais, hidrocefalia, icterícia com esplenomegalia, retardo mental, convulsões, hipertonia e paralisia, deficiência visual grave e surdez), com taxa de letalidade de 12% (Eichenwald 1959).

A maioria dos neonatos com toxoplasmose congênita tem doença subclínica ao nascer. Contudo, esses recém-nascidos podem apresentar anormalidades da retina e do sistema nervoso central quando são submetidos a exames especializados. Ademais, apresentam risco de seqüelas oftalmológicas e neurológicas graves a longo prazo (Wilson et al. 1980, Guerina 1994).

Com relação à toxoplasmose ocular pode-se identificar duas formas distintas, a congênita e a adquirida. Em ambas, o acometimento pode ser precoce ou tardio, podendo em alguns casos, manifestar-se clinicamente pela primeira vez, anos depois da infecção sistêmica (De Vroede et al. 1979). A identificação de retinocoroidite pela fundoscopia ocular é muito freqüente, mesmo nos casos sem outros sintomas, e permite realizar o diagnóstico presuntivo de infecção congênita. Contudo, a doença é comumente confirmada através de testes sorológicos, devido à dificuldade de se fazer o diagnóstico clínico ou parasitológico (De Vroede et al. 1979).

2.4. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

2.4.1. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA TOXOPLASMOSE

O parasito pode ser isolado ou ter seus componentes antigênicos isolados em líquidos orgânicos, em cortes de tecidos ou em esfregaços de material de biópsias e necrópsias, principalmente da placenta, de fetos e natimortos (Maciel et al. 1984, Oliveira et al. 1986, Camargo 1989, Stray-Pedersen 1993, Frenkel & Lynfield 1997, Beazley & Egermam 1998).

A pesquisa direta de antígenos de *T. gondii*, no material clínico, é utilizada para se fazer o diagnóstico diferencial entre vários estágios da toxoplasmose. A pesquisa de IgG e IgM não são capazes de dar a idéia exata da parasitemia que por ventura esteja ocorrendo devido à infecção primária ou reativação e se está ocorrendo ou não, infecção aguda com risco real para o paciente (Camargo 1989).

A pesquisa direta de antígenos de *T. gondii* se faz necessária nos seguintes casos:

1 – Detecção de parasitos durante a fase aguda de adultos imunocompetentes em material de biópsia, de cistos no SNC, em leite, sangue, saliva, medula óssea e exsudatos.

2 – Indivíduos imunocomprometidos, soroconvertidos que sofreram reagudização, ou soronegativos que sofreram infecção primária sintomática.

3 – Mulheres grávidas sem sorologia pré-natal inicial ou anteriormente negativas para *T. gondii*, que apresentem IgG e/ou IgM positivos durante a gravidez, sendo necessário a repetição do teste de *scrennig* com IFI e teste de avidéz da IgG para confirmar a infecção aguda e se tentar o diagnóstico pré-natal precoce da toxoplasmose congênita no feto.

A determinação da presença do parasito na placenta, LA, e sangue do cordão umbilical caracterizam parasitemia fetal e perfil agudo da infecção, sendo que o diagnóstico precoce permite a instituição rápida da terapêutica adequada (Hohlfeld et al. 1994).

A identificação do parasito pode ser realizada diretamente através da inoculação do material biológico a ser examinado por via intraperitoneal em camundongos, com posterior observação da ocorrência de soroconversão nesses animais, cujos encéfalos serão examinados com o objetivo de se detectar o parasito (Calvão 2002). O *Toxoplasma* pode

ser identificado no exsudato peritoneal em uma semana ou no encéfalo após 4 a 6 semanas (Camargo 1989, Kawazoe 1995, Frenkel 1997, Beazley & Egermam 1998).

Uma outra forma direta de investigação diagnóstica são os modelos experimentais utilizados para experimentos do parasito que incluem as culturas células de mamíferos como fibroblastos humanos ou outras linhagens celulares, e embrião de galinha (Camargo 1989, Frenkel 1997).

Dentre os animais sensíveis à inoculação, citam-se os hamsters, cobaias, camundongos e coelhos. Desses, os camundongos são os mais susceptíveis à infecção por inoculação peritoneal, podendo fornecer milhões de taquizoítos por mL de exsudato em até 3 dias.

Uma vez isolada, a cepa de *T. gondii* pode ser mantida para fins experimentais mediante a reinoculação em camundongos (Calvão 2002). Entretanto a criopreservação *in vitro* tem sido um método prático para se evitar a perda da cepa e camundongos, quanto à necessidade constante de inoculações que despendem tempo, material e pessoal técnico treinado. Assim taquizoítos podem ser mantidos sem perdas da viabilidade e virulência, entre -20°C e -60°C por 8 semanas, a -70°C por 200 dias e em nitrogênio líquido -196°C por tempo indeterminado.

A sobrevivência dos camundongos infectados é curta, entre 4 a 10 dias, ocorrendo acometimento visceral com lesões necróticas, podendo desenvolver cistos teciduais na musculatura e encéfalo. Com os materiais obtidos dos camundongos infectados experimentalmente pode-se preparar esfregaços a serem corados pelo Giemsa e com material de biópsia, fazem-se os cortes histológicos e coloração pela hematoxilina-eosina. O diagnóstico desta protozoose pode ser realizado pela pesquisa direta de cistos e taquizoítas em tecidos de camundongos, através de cortes histológicos, seja corados pela Hematoxilina e Eosina -HE, seja pela Imunohistoquímica-IH (Rosa et al. 2001).

Em cortes histológicos corados pela HE pode ser difícil a identificação do *T. gondii*, pois o parasito não possui características tintoriais próprias que permitam distinguí-lo nitidamente das células adjacentes, podendo ser confundido com núcleos ou fragmentos nucleares que se coram de forma semelhante (Tsunematsu et al. 1964, Barbosa 1988). Essa técnica, como as demais de pesquisa direta do parasito, exige grande experiência do

observador, análise de vários cortes e/ou lâminas, que dificultam a sua utilização na rotina, apesar da boa sensibilidade.

Métodos de diagnóstico imuno-histoquímico são específicos e a partir do desenvolvimento do método da peroxidase-antiperoxidase (PAP) por Sternberger et al. (1970), vêm sendo usada no diagnóstico pós-morte de diversos agentes infecciosos, particularmente do *T. gondii* na intimidade dos tecidos (Conley et al. 1981, Davidson et al. 1993, Falangola & Petite 1993, Brezin et al. 1994, Viotti et al. 1995). Modificações foram introduzidas e Dubey & Lin (1994), utilizando a técnica imunoenzimática da avidina-biotina, para a detecção de cistos do *T. gondii*.

A parasitemia tem sido detectada com maior sensibilidade através dos métodos de biologia molecular, em especial pela reação em cadeia de polimerase (PCR), com a vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado com o isolamento do parasito. Contudo, há limitação da técnica porque a reação não discrimina se o material amplificado provém de parasitos viáveis ou de fragmentos (Calvão 2002).

Em indivíduos imunocompetentes com toxoplasmose aguda, a PCR tem detectado a presença do parasito em tecido de biópsia e em amostras de sangue periférico. Em HIV positivos a PCR detecta o parasito no sangue periférico, material de biópsia, fluido de material bronquioalveolar e líquido.

Em fetos, o isolamento do parasito associado à PCR, incrementa o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, demonstrando maior sensibilidade do que o método de isolamento de parasitos em culturas e camundongos (Calvão 2002). A identificação dos antígenos parasitários pode ser feita no LA, no sangue do feto ou RN, no líquido, no tecido encefálico ou placentário (Dupouy-Camet et al. 1992, Camargo 1996). Na gestante, a pesquisa por PCR, no LA pode ser realizada a partir da 12ª semana de gravidez, com poucas complicações (Foulon et al. 1999). Atualmente, dá-se preferência a esse método ao invés da cordocentese por apresentar menores riscos para o feto e por ser mais específico (Braga et al. 1994, Fricker-Hidalgo et al. 1998). Além disto, a pesquisa do DNA do *T. gondii* não sofre influência da imaturidade imunológica do feto ou do recém nascido (Braga et al. 1994). Os resultados podem ser liberados em 24h com até 100% de sensibilidade (Beazley & Ergeman 1998, Fricker-Hidalgo et al. 1998).

2.4.2. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA TOXOPLASMOSE

Classicamente, o diagnóstico da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito através de testes sorológicos. A pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas antiToxoplasma constitui a principal contribuição laboratorial para o diagnóstico da doença. Além disso, a presença dos anticorpos antiToxoplasma no curso da infecção, permite a análise de perfis sorológicos muito característicos, seja de infecção recente, em fase aguda, ou de infecção antiga em fase de latência ou crônica.

Em indivíduos imunocompetentes os testes sorológicos com pesquisa de IgG e IgM são suficientes para o diagnóstico, por serem sensíveis, específicos e de fácil execução (Camargo 2001). Porém, para o diagnóstico em adultos imunocomprometidos e na infecção fetal, há necessidade de testes parasitológicos para a detecção do *T. gondii*.

Existem dois tipos principais de testes sorológicos: os que usam organismos inteiros como antígenos e aqueles que utilizam extrato antigênico de parasitos lisados. Os primeiros são representados pelo teste do corante de Sabin Feldman, pela imunofluorescência indireta e pelo ensaio de aglutinação por imunoabsorção de IgM, e testes de avidéz da IgG, que demonstram principalmente anticorpos dirigidos contra os antígenos da membrana do parasito. Os demais que usam o extrato antigênico de parasitos lisados, incluem o teste de hemaglutinação passiva e o ensaio imunoenzimático (Duffy et al. 1989).

Os resultados sorológicos têm apenas valor de probabilidade, devendo ser interpretados com cautela, pois a resposta imunológica à infecção pelo Toxoplasma pode apresentar variações individuais (Beazley & Egermam 1998). Além disso, a alta sensibilidade de alguns testes laboratoriais que detectam a presença de anticorpo de fase aguda, IgM, pode induzir ao erro de interpretação por permanecer positivo durante um longo período após a infecção.

O teste de Sabin-Feldman é fundamentado em princípio imunológico, onde os parasitos expostos a um soro contendo anticorpos antiToxoplasma sofrem lise da membrana citoplasmática após a reação antígeno-anticorpo e ativação do complemento, sendo corados por azul de metileno. Quando existem anticorpos contra o parasito no soro, este não se cora (Sabin & Feldman 1948). Apesar de ser um teste de alta especificidade e sensibilidade, seu

uso se tornou restrito em decorrência da complexidade técnica empregada e do risco de contaminação com os antígenos vivos de *T. gondii* (Remington et al. 2001).

O teste de hemaglutinação passiva descrito originalmente por Jacobs & Lunde (1957) com hemácias de carneiro recobertas por componentes do parasito, principalmente citoplasmáticos, apresentava baixa sensibilidade. Esse teste não detectava IgM ou IgG de baixa avidéz, além de sofrer a interferência de anticorpos heterófilos com conseqüente resultado falso-positivo. Tais falhas foram solucionadas ao se utilizarem hemácias de aves, recobertas com antígenos completos do parasito, aglutináveis por anticorpos IgG e IgM, tornando o teste altamente sensível. É considerado um teste prático de baixo custo, não exigindo equipamento sofisticado e um bom método para triagem da toxoplasmose. Ocasionalmente, observam-se resultados falso-positivos por interferência de anticorpos IgM “naturais”, aglutininas IgM não-específicas, em geral de títulos baixos. Distingue-se de reações específicas por permanecerem com títulos inalterados, enquanto aquelas se elevam em poucos dias na fase aguda da toxoplasmose (Camargo 1989).

Outro método sorológico freqüentemente utilizado em nosso meio é o teste de imunofluorescência indireta, considerado de boa especificidade e sensibilidade, comparável ao teste do corante de Sabin-Feldman. A reação de imunofluorescência tem a vantagem de utilizar Toxoplasmas preservados, fixados em lâminas de microscopia, tornando-o muito mais prático e seguro para a rotina laboratorial. Além do mais, esse teste permite a identificação dos anticorpos segundo as classes de imunoglobulinas (Frenkel et al. 1997). Quanto à IgM, os testes podem apresentar resultados falso-positivos, pela interferência de fator reumatóide, eventualmente presentes no soro (Camargo 1989, Beazley & Egermam 1998), e falso-negativos, devido à competição que os anticorpos IgG fazem aos IgM, impedindo que esses se fixem aos antígenos parasitários (Camargo et al. 1972).

A introdução do ensaio imunoenzimático (ELISA) trouxe um grande avanço para o diagnóstico da doença. Através da técnica (Enzyme linked fluorecent assay) ELFA foi possível detectar a presença de IgM específica para *T. gondii* em 92% dos indivíduos com toxoplasmose recentemente adquirida, e que eram negativos na reação de imunofluorescência. A reação de aglutinação por imunoabsorção de IgM (ISAGA) é utilizada para identificação de anticorpos da classe IgM, sendo importante no diagnóstico

de infecção aguda. Os antígenos adicionados às placas constituem-se em uma suspensão de Toxoplasmas, que se aglutinam na presença de IgM específica (Desmonts et al. 1981).

No início da década de noventa, foi desenvolvido o teste ELISA – IgG para avidéz, que parece ser excelente método de diagnóstico de infecção aguda adquirida. Esse método avalia a avidéz ou afinidade funcional de ligação ao antígeno dos anticorpos IgG contra o *T. gondii*, separando os de baixa afinidade, produzidos numa fase inicial da infecção, dos anticorpos de alta afinidade indicativos de infecção crônica (Joynson et al. 1990, Lappalainen et al. 1992, Beazley & Egermam 1998).

Para a pesquisa de anticorpos IgA e IgE específicos para a toxoplasmose, utilizam-se as técnicas imunoenzimáticas, tanto a indireta como a de captura, que são importantes marcadores de infecções recentes, inclusive congênicas (Decoster et al. 1992, Wong et al. 1993).

2.4.3 - DIAGNÓSTICO NA GESTANTE E NO FETO

O diagnóstico de toxoplasmose na gestante é confirmado através de pacientes soronegativas que apresentam soroconversão e daquelas com perfil sorológico de toxoplasmose recém-adquirida. Devido ao grande número de gestantes que não apresentam anticorpos antiToxoplasma e da necessidade de repetição dos testes a cada quatro ou cinco semanas, naquelas que permanecem soronegativas, são necessários testes sensíveis para a triagem, porém de baixo custo e de execução simples, capazes de detectar anticorpos IgG e IgM e de fornecer resultados em curto prazo. A triagem da gestante de risco na fase aguda da toxoplasmose é feita geralmente pelo teste de imunofluorescência Indireta, sendo o mais disponível nos laboratórios da rede pública, este se mostra muito prático e adequado, porém há uma percentagem significativa de testes inconclusivos (Camargo 1989). De acordo com os resultados, a gestante será considerada como: - imune na presença de IgG positiva e IgM negativa; - suscetível quando os anticorpos IgG e IgM são negativos; imune ou portadora de infecção aguda se IgG e IgM estão positivas.

A maior dificuldade no diagnóstico sorológico ocorre nos casos em que a IgM está positiva por ocasião da primeira consulta pré-natal. A sua presença nem sempre indica uma

infecção aguda recente, pois houve aumento da sensibilidade dos testes sorológicos para detecção de IgM por períodos superiores a um ano após a infecção aguda, necessita-se recorrer a outros métodos sorológicos para tentar estabelecer, retrospectivamente o momento da soroconversão. O diagnóstico da infecção aguda nesses casos exige a demonstração de aumento nos títulos de anticorpos, maior ou igual a três diluições, em duas amostras colhidas com intervalo de três semanas e testadas em paralelo. Às vezes há necessidade da realização de outros testes como dosagem de IgA, IgE ou o teste de avidéz de IgG (Camargo et al. 1991). Idealmente, deve-se utilizar uma combinação de dois testes para confirmação diagnóstica (Remington et al. 2001).

Nas gestantes com quadro clínico sugestivo de toxoplasmose, realizam-se testes que detectam anticorpos IgM específicos, tais como DS-ELISA IgM e ISAGA IgM (Remington et al. 2001). Esses se positivam usualmente na primeira ou segunda semanas de infecção e podem persistir positivos por meses ou anos. Um teste negativo para IgM diminui a possibilidade de infecção atual ou recente (Wallon et al. 1999). Se os resultados indicam infecção aguda materna, o estabelecimento do envolvimento fetal torna-se crítico (Wong & Remington 1994).

O diagnóstico da infecção fetal pelo *T. gondii* baseia-se na análise conjunta do sangue fetal e do líquido amniótico, colhido a partir da 20ª semana de gestação aliada à avaliação ultra-sonográfica da morfologia fetal (Daffos et al. 1988). Os achados ultra-sonográficos que podem surgir devido à infecção incluem: hidrocefalia, calcificações intracranianas, aumento da circunferência abdominal por hepatoesplenomegalia, ascite fetal e aumento da espessura placentária (Daffos et al. 1988).

A análise do sangue fetal obtido por cordocentese após a 20ª semana de gravidez pode demonstrar a presença de IgM específica contra o *T. gondii*, assim como no líquido amniótico. Utilizando essa metodologia pode-se diagnosticar 90% dos fetos acometidos intra-útero (Daffos et al. 1988). Porém, a ausência da correlação desses dados com a gravidade da infecção fetal e, principalmente, pela morbidade e letalidade causadas pela cordocentese, de 1% a 2% em mãos muito hábeis, impõe sua indicação apenas em casos de grande suspeita de risco fetal.

Para o diagnóstico da infecção fetal, há necessidade de testes diretos para a detecção do *T. gondii*. Esta detecção pode ser feita por cultura em células ou inoculação em

camundongos, por determinação dos antígenos parasitários através de técnica imuno-histoquímica ou, principalmente por identificação de seqüências de ácidos nucléicos através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em qualquer tipo de tecido ou fluido corporal (Grover et al. 1990, Cazenave et al. 1992, Hohlfeld et al. 1994).

A pesquisa do *Toxoplasma* no líquido amniótico, antes da 20ª semana, através da PCR, confere sensibilidade de até 100% (Hohlfeld et al. 1994). A demonstração de material genômico do *T. gondii*, isto é, de seqüências de seu DNA, pode fornecer resultados no prazo de um dia, permitindo a identificação de praticamente 100% dos casos (Grover et al. 1990). Apesar de já padronizada essa técnica não está incluída na rotina dos laboratórios brasileiros, porém no mundo já é uma técnica rotineira.

2.4.4 - DIAGNÓSTICO NO RECÉM-NASCIDO

O diagnóstico da toxoplasmose no recém-nascido baseia-se principalmente no acompanhamento sorológico, interpretado de forma criteriosa e sempre associado aos dados clínicos e epidemiológicos (Holliman et al. 1990).

A pesquisa de anticorpos IgM tem sido amplamente executada como marcador de toxoplasmose congênita pós-natal. Devido ao seu peso molecular, a IgM não atravessa a barreira placentária íntegra e mesmo em caso de lesão de placenta, sua meia-vida é de somente cinco dias. Por esse motivo, a detecção da queda ou o aumento nos títulos de anticorpos da classe IgM se mostra como ideal para o diagnóstico de infecção neonatal aguda, porque permite a separação dos anticorpos IgM produzidos pela criança daqueles anticorpos IgG transferidos passivamente pela mãe (Naessens et al. 1999). As melhores técnicas para sua detecção compreendem o DS-ELISA e o ISAGA, que detectam anticorpos específicos IgM em cerca de 80% dos casos, enquanto que para o teste de imunofluorescência esse valor é de 25% (Wallon et al. 1999).

Na ausência da IgM, o achado da IgG anti*Toxoplasma* no soro do recém-nascido assintomático não apresenta maior significado diagnóstico, pois pode representar simples transferência passiva de anticorpos maternos. Nesse caso, geralmente ocorre queda dos títulos da IgG após o quarto mês de vida, com tendência a negatização do exame até o final

do primeiro ano (Alford et al. 1974, Thulliez et al. 1992). Entretanto, se o recém-nascido apresenta indícios clínicos sugestivos de toxoplasmose, com persistência ou elevação dos títulos de IgG após o primeiro ano, existe alto valor preditivo para a toxoplasmose congênita (Joynson et al. 1990).

A pesquisa de anticorpos IgA tem sido recomendada para diagnóstico da infecção neonatal (Stepick-Biek et al. 1990). Além disso, a detecção de anticorpos IgE antiToxoplasma também pode ser um indicativo de toxoplasmose congênita.

Adicionalmente está sendo estudada a PCR, na busca de marcadores moleculares do parasito em diferentes fluidos biológicos como sangue, urina e líquido para o diagnóstico da doença no recém-nascido (Van de Vem et al. 1991, Couvreur et al. 1995, Fuentes et al. 1996) além da inoculação em camundongos.

Após a confirmação diagnóstica materna e/ou neonatal, o tratamento é instituído o mais precocemente possível.

2.5. TRATAMENTO

2.5.1. TRATAMENTO DA GESTANTE COM TOXOPLASMOSE AGUDA

O tratamento da gestante pode prevenir ou atenuar a doença congênita. A espiramicina é indicada para o tratamento da infecção aguda, pois parece controlar a infecção placentária e reduzir as taxas de transmissão fetal em até 60%. Contudo, enquanto a infecção parasitária da placenta e do feto são reduzidas nos pacientes tratados com espiramicina, a proporção de casos graves não se modifica em crianças infectadas (Desmonts & Couvreur et al. 1974). Sendo assim, parece que enquanto a espiramicina durante a gestação possui um efeito preventivo contra a transmissão materno-fetal, ela não altera o padrão clínico da toxoplasmose congênita manifesta.

A associação de sulfadiazina e pirimetamina, segundo Hohlfeld et al (1989), deve ser utilizada após a propedêutica fetal invasiva, se o feto estiver infectado. O uso desta combinação de drogas é eficaz contra a fetopatia progressiva. Entretanto, esta associação deve ser evitada no primeiro trimestre da gravidez, devido ao efeito potencialmente teratogênico da Pirimetamina (Frenkel 2002).

O tratamento da criança infectada sintomática ou assintomática deve ser iniciado precocemente e prolongar-se até no mínimo um ano de idade, pois pode minimizar as repercussões auditivas e visuais e melhorar o prognóstico. Vários esquemas terapêuticos têm sido utilizados. O uso alternado de espiramicina com sulfadiazina e pirimetamina durante um ano é o mais difundido (Couvreur et al. 1984). Acredita-se que se o uso sulfadiazina e pirimetamina por um ano permite um melhor controle das lesões teciduais causadas pelo parasito (McAuley et al. 1994).

A morbidade e a mortalidade perinatal associadas à toxoplasmose adquirida na gestação, assim como as repercussões dela decorrentes, justificam que programas de prevenção sejam instituídos em nosso meio.

2.6 – MEDIDAS PROFILÁTICAS

A prevenção da toxoplasmose congênita pode ser dividida em três categorias: primária, secundária e terciária. A prevenção primária caracteriza-se basicamente por programas de educação e saúde pública, recomendando às gestantes que evitem contato com materiais potencialmente contaminados com fezes de gatos e ingestão de carne crua ou mal cozida. Além disso, enfatiza-se o uso de luvas ao manusear a terra. Estas orientações, quando aplicadas no pré-natal, contribuem com a redução de 63% da primoinfecção na gravidez (Foulon et al. 1992).

A prevenção secundária consiste em tentar evitar a transmissão transplacentária do parasito, através da adoção do diagnóstico precoce da infecção na gestante e de seu tratamento antiparasitário com Espiramicina ou Sulfadiazina associados a Pirimetamina (Breugelmans et al. 2004).

A prevenção terciária finalmente concentra seus esforços em realizar um diagnóstico precoce através da dosagem de anticorpos específicos IgA e IgM em sangue coletado de recém-nascido que permita a introdução de esquema terapêutico para prevenir ou minimizar as seqüelas (Hall 1992).

A instituição de programas educacionais para gestantes e imunossuprimidos associada à triagem sorológica pré-natal pode reduzir de maneira significativa, as taxas de infecção pelo *T. gondii*.

O rastreamento sorológico da toxoplasmose no pré-natal é obrigatório em poucos países, como na França e Áustria. Esse investimento comprovadamente tem reduzido as taxas de infecção congênita e mostra resultados sociais e econômicos positivos (Stray-Pedersen & Jenum 1992).

Em Goiânia, a partir de setembro de 2002 teve início uma ação conjunta entre a UFG e as Secretarias Estadual e Municipal de Saúde num programa intitulado “Controle da Transmissão Vertical da Toxoplasmose”, que permitiu a realização dessa pesquisa. Passou a se incluir a sorologia para toxoplasmose no pré-natal, o que possibilitou o encontro das pacientes agudamente infectadas, ou reinfectedas, incluídas nesse estudo.

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 - PACIENTES

Durante o período compreendido entre setembro de 2002 a janeiro de 2005, foram acompanhadas no Hospital das Clínicas (HC-UFG), grávidas encaminhadas ao pré-natal por apresentarem exames clínicos e/ou sorológico de rotina para toxoplasmose compatível com infecção aguda confirmada com: presença de IgM, o teste de avidéz da IgG menor que 20. Nova sorologia foi realizada utilizando o teste ELISA para confirmação da triagem sorológica. Essas pacientes foram encaminhadas para os centros de referência para a transmissão vertical da toxoplasmose (no HC-UFG e Hospital Materno Infantil), para o diagnóstico de infecção fetal onde foram coletados líquido amniótico e sangue fetal por amniocentese, e cordocentese respectivamente.

A amniocentese foi guiada por ultra-som e realizada entre a 20^a e a 38^a semana de gestação. Após a identificação da localização do feto e placenta, puncionou-se a cavidade amniótica com agulha de 15 cm, coletando em seguida 20 mL de líquido amniótico. A cordocentese, também foi guiada por ultra-som e realizada no mesmo momento do procedimento invasivo anterior (Fig. 2 e 3). Feita a punção direta do cordão umbilical, obtendo cerca de 3mL de sangue por procedimento. Os materiais obtidos nesses procedimentos foram encaminhados para o Laboratório de Protozoologia do IPTSP-UFG onde foram processados segundo protocolo.

Figura 2 – Esquema da coleta de líquido amniótico por amniocentese.

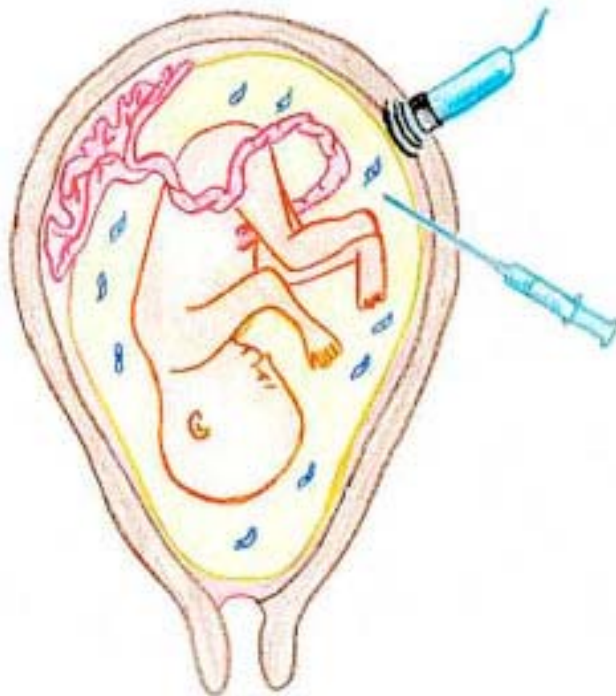


Figura 3 – Esquema da coleta de sangue fetal por cordocentese.



Nos recém-nascidos das mulheres identificadas como tendo toxoplasmose aguda durante a gestação foram colhidos sangue periférico e líquido cefalorraquidiano para confirmação diagnóstica de transmissão congênita. Esse material também foi enviado ao laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano do IPTSP-UFG.

3.2 - PROCESSAMENTO DO MATERIAL

50 amostras de líquido amniótico, 12 de líquido, 65 de sangue fetal e 11 de sangue de recém-nascidos foram centrifugados a 3000 rpm, por dez minutos, sendo que o sedimento ou papa de hemáceas foram inoculados via intra peritoneal com uma seringa de 1 mL em um grupo de três camundongos (0,2 mL por animal) isogênicos BALB-c, machos ou fêmeas, em média com 30g e 30 dias de idade.

Foram utilizados 465 camundongos na primeira parte do experimento e 450 na segunda, totalizando 915 animais.

3.3 - ACOMPANHAMENTO DOS CAMUNDONGOS

Os animais foram acompanhados por 60 dias, sendo então sacrificados por deslocamento da coluna vertebral. O repique de macerado cerebral via intraperitoneal foi realizado em um segundo grupo de camundongos.

Retirou-se o sangue (por punção cardíaca) e o encéfalo dos animais. Do sangue, após a obtenção do soro, realizou-se sorologia, para a detecção de anticorpos das classes IgG e IgM através de IFI. Do encéfalo, confeccionou-se lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina.

Durante o acompanhamento dos animais, o aparecimento de sintomas clínicos, tais como arrepiamento do pelo, emagrecimento e letargia, foram considerados como indicadores de infecção, sendo então realizado a lavagem peritoneal nestes animais a procura das formas taquizoítas.

3.3.1 - PUNÇÃO CARDÍACA

Nos ensaios experimentais, técnicas que otimizem os resultados desejados são necessárias. A sangria é utilizada para obtenção de um volume de sangue significativo, mas em pequenos animais a mortalidade é alta.

Etapas da coleta intracardíaca:

Anestesiou-se o animal em posição de decúbito dorsal, desinfetando-se a região torácica (álcool-iodado), com seringa e agulha heparinizada, introduziu-se a agulha 24 x ½ com seringa de 1ml estéril, paralela à linha do esterno, em direção à esquerda do animal, no antepenúltimo espaço intercostal, em um ângulo de 45° para aspirar do coração o volume desejado.

O volume de sangue compatível com a sobrevivência é calculado pela fórmula, “Volume a sangrar = (Peso Corporal x 0,09) x 0,20”. O volume de sangue conseguido em cada animal compatível com a vida do mesmo foi em média de 0,4mL, quando os animais seriam sacrificados foi possível obter até 1 mL de sangue total.

3.4 - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM SORO DE CAMUNDONGO.

Utilizou-se a reação de Imunofluorescência Indireta-IFI, (Camargo, 1974) sendo o antígeno produzido no laboratório, utilizando a cepa RH, mantida no laboratório de Protozoologia do IPTSP-UFG. A partir de lavado peritoneal de camundongos BALB/c previamente inoculados, seguida de lavagens com solução salina tamponada (PBS) 0.01M pH 7.2 sob centrifugação a 700g/10 minutos e conservados a temperatura de 4° a 8°C. A técnica foi realizada com os soros diluídos em PBS 0.01M pH 7.2, diluição seriada, a partir de 1:10. Foi usado soro conjugado fluorescente anticamundongo na diluição de 1:200 para os conjugados anti-IgM e anti-IgG de camundongo (conjugado anticadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA).

3.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO ENCÉFALO DOS CAMUNDONGOS

3.5.1 - PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

De cada experimento foram obtidos seis encéfalos, três do 1º inóculo e três do 2º. Foram sorteados dois encéfalos sendo um de cada inóculo. Estes foram cortados ao meio no sentido longitudinal com espessura de 5 mm e fixados em álcool 70% por 24h e então transferidos para o formaldeído tamponado a 10%.

Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, incluídos em parafina a quente e confeccionados blocos. Realizaram-se cortes histológicos seriados com espessura de 5µm. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro. Foram feitos dez cortes de cada encéfalo. O restante do bloco foi arquivado para estudos futuros. Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) segundo Junqueira (1983).

As lâminas foram examinadas ao microscópio de luz (Olympus CX-31), com objetivas de 10, 40, e 100X.

Nos cortes onde foi possível a visualização de formas do parasito, tais como, forma taquizoíta ou cística, foram analisados os seguintes processos patológicos: edema (E), inflamação (I), hiperemia no parênquima (HIP), hiperemia na meninge (HIM), hemorragia no parênquima (HEP), hemorragia na meninge (HEM) e necrose coagulativa (NC). As alterações patológicas foram classificadas de forma semiquantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreta (com comprometimento de até 25% da área), moderada de 26% a 50% e acentuada acima de 50%.

4 – RESULTADOS

Esses resultados foram apresentados em forma de artigos, sendo que os dois primeiros objetivos específicos são respondidos no primeiro artigo, o segundo e terceiro, no segundo artigo.

1º Artigo: **Otimização do diagnóstico parasitológico da toxoplasmose congênita.**

A ser submetido à **Revista Memórias Instituto Oswaldo Cruz.**

2º. Artigo: **Estudo anatomopatológico em encéfalos de camundongos BALB/c infetados experimentalmente com *Toxoplasma gondii***

A ser submetido à **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**

OBS: Normas para publicação das respectivas revistas anexo I e II.

4.1 – 1º Artigo

OTIMIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.

Marcos Gontijo da Silva¹, Ruy de Souza Lino Junior², Tatiane Luiza da Costa³, Joanna Darc Herzog Soares⁴, Waldemar Naves do Amaral⁵, Mariza Martins Avelino⁶, Ana Maria de Castro⁷.

(1) Mestre em Medicina Tropical na área de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG). (2) Profº. Adjunto da disciplina de Patologia geral no IPTSP-UFG. (3) Mestranda em Medicina Tropical na área de Parasitologia do IPTSP-UFG. (4) Profª. Adjunto da disciplina de Parasitologia do IPTSP-UFG. (5) Profº. Adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFG. (6) Profª. Adjunto do departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina da UFG. (7) Profª. Adjunto da disciplina de Parasitologia e, orientadora desse estudo dentro do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical no IPTSP-UFG.

Autor de correspondência: Ana Maria de Castro (amaria@iptsp.ufg.br)

Laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano do IPTSP-UFG. Rua 235 esq/ 1ª. av. s/n Setor Leste Universitário, Goiânia Goiás –74605-050.

RESUMO

O diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita é de fundamental importância, pois possibilita o tratamento e redução das seqüelas que esse pode provocar ao concepto. O diagnóstico sorológico isolado não permite o diagnóstico quando não identifica os anticorpos das classes IgA, IgM ou IgG de baixa avidéz, que não atravessam a barreira placentária. Por isso, a identificação da parasitemia é importante sendo feita pela demonstração do parasito no lavado peritoneal de camundongos inoculados com materiais biológicos suspeitos, mas esse método é pouco sensível e demorado. Essa pesquisa tem como objetivos a otimização da inoculação em camundongo, através da realização da

sorologia desses, e histopatologia encefálica para identificar a sua contaminação. Em 138 amostras de fetos e/ou recém nascidos provenientes de grávidas com toxoplasmose ativa inoculadas intraperitonealmente nos camundongos, apenas cinco mostraram-se positivas pela demonstração do parasito no lavado peritoneal. A histopatologia demonstrou o agente em 45 casos e em 67 casos identificou-se a presença de anticorpos antitoxoplasmas na corrente sanguínea dos camundongos pela técnica de Imunofluorescência Indireta. A sorologia dos camundongos e a histopatologia dos encéfalos, além de reduzir o tempo da liberação dos resultados de 120 para 60 dias possibilitaram um aumento dos casos positivos de 3,6% para 50,4% e 33,8% respectivamente.

Palavras Chaves. Toxoplasmose congênita, Diagnóstico parasitológico, Inoculação em camundongos, sorologia experimental.

INTRODUÇÃO

No Brasil, 25 a 40% das gestantes são soronegativas para a toxoplasmose (Vaz et al. 1990, Spalding 2000, Spalding et al. 2003). O risco de infecção aguda durante a gestação é de aproximadamente 1% e a transmissão fetal ocorre em 30% dos casos, levando à infecção fetal de gravidade variável (Wirdein et al. 1999, Friedman et al. 1999). As infecções congênitas se encontram entre as principais causas de morbidade e mortalidade no período neonatal (Wallon et al. 2004). Em Goiânia, a toxoplasmose congênita é de relevante importância, pela elevadíssima incidência de 8,9% (Avelino et al. 2003).

Freqüentemente há subdiagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose congênita devido ao fato de 90% dos fetos e/ou recém-nascidos infectados serem assintomáticos ou oligossintomáticos (Wong & Remington 1994, Wallon et al. 2004), podendo permanecer assim por anos. A transmissão congênita ocorre quando a mulher adquire a primoinfecção durante a gestação e/ou reativação da infecção crônica (Santana et al. 2003), ocorrendo de forma variável, dependendo da localização considerada, variando de 0,2 a 34/1000 nascimentos (Williams et al. 1981, Coutinho et al. 1983, Pedreira 1995, Avelino 2000).

O parasito atinge o concepto por via transplacentária causando danos de diferentes graus de gravidade, dependendo da virulência da cepa do parasito, da resposta imune da mãe e do período gestacional em que a mulher se encontra, podendo resultar, inclusive, em morte fetal ou em graves manifestações clínicas (Desmonts et al. 1974, Figueiro-Filho et al.

2005). As mais freqüentes são a retinocoroidite e as alterações neurológicas. No soro do recém-nascido, a presença de títulos elevados de anticorpos da classe IgG, aumentam ou permanecem positivos por período de um a 18 meses, podendo ser indicativo de toxoplasmose congênita, e os que decrescem e tendem a se tornar negativos representam os anticorpos maternos de transferência passiva (Camargo 1995). A infecção fetal poderia ser atenuada ou prevenida quando houver tratamento materno após um diagnóstico precoce (Wong & Remington 1994).

Anticorpos específicos das classes IgM, IgA, IgE e IgG são produzidos em resposta à infecção pelo *T. gondii*, sendo que a IgM, IgA e IgE são indicadores de infecção recente e/ou ativa e a IgG, marcador de infecção crônica e permanece por toda a vida no caso da infecção adquirida (Grover et al. 1990, Cazanave 1993).

As técnicas sorológicas habitualmente utilizadas para o diagnóstico da toxoplasmose são: Imunofluorescência Indireta (IFI), Imunoabsorção (ISAGA) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Essas técnicas quando utilizadas em conjunto aumentam a sensibilidade dos resultados, chegando até 89,5% nas grávidas (Denmark & Chessum 1978, Sounis 1979, Pratlong et al. 1994, Camargo 1995).

A triagem da gestante de risco na fase aguda da toxoplasmose é feita geralmente pelo teste de Imunofluorescência Indireta, sendo o mais disponível nos laboratórios da rede pública, e se mostra muito prático e adequado, porém há uma percentagem significativa de testes inconclusivos (Camargo et al. 1989). Atualmente, tem sido utilizado o teste em papel filtro para a triagem pré-natal, que tem elevada sensibilidade e especificidade (Figueiro-Filho et al. 2005).

Em fetos e recém nascidos essa técnicas são imprecisas devido imaturidade imunológica do feto e/ou RN e a interferência dos elevados níveis de anticorpos maternos na corrente sangüínea fetal, que inibem a formação de IgM sendo necessário assim, a confirmação do diagnóstico através de técnicas parasitológicas que evidenciem a presença do parasito no material examinado, conseqüentemente indicando infecção ativa e confirmando, de acordo com o material examinado, a transmissão congênita (Montoya & Liesenfeld 2004).

Os métodos parasitológicos na fase crônica da toxoplasmose são de baixa sensibilidade, devido à ampla disseminação do seu agente e ao seu tropismo pelos diferentes tecidos (Wong & Remington 1993, Amendoeira et al. 1999, Rey 2001).

De igual forma, sabe-se que a parasitemia é detectável de forma intermitente em alguns pacientes (Hofflin & Remington 1985, Filice 1993, Kompalic-Cristo 2004). Por ser um parasito intracelular obrigatório, a cultura in vitro tem custo elevado e também necessita de longo tempo para fornecer resultado, muitas vezes só sendo efetiva em menos de 50% dos casos. O isolamento do parasito pode ser feito com a inoculação em camundongos, o que é mais sensível, o longo período de observação e manutenção de animais em biotérios apresenta uma grandes dificuldades de aplicação deste método (Grover et al. 1990, Hitt & Filice 1992, James 1996).

O protocolo de pesquisa à qual esse trabalho está vinculado utiliza a administração da Espiramicina na dose de 3g/dia, em toda gestante suspeita de estar agudamente infectada, o que dificulta a confirmação parasitológica pela diminuição da parasitemia circulante. É de suma importância que a sorologia duvidosa seja confirmada por técnicas parasitológicas, sendo a mais utilizada a inoculação de materiais biológicos em camundongos.

Esse trabalho objetivou a otimização da técnica de inoculação de material biológico humano em peritoneo de camundongos para a detecção de infecção toxoplásmica. Para tal, analisou-se a sorologia e histopatologia encefálica dos camundongos inoculados com liquido amniótico, sangue fetal de fetos e sangue periférico e líquido cefalorraquidiano de recém-nascidos, provenientes de grávidas com toxoplasmose ativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período compreendido entre setembro de 2002 a janeiro de 2005, foram acompanhadas no Hospital das Clínicas (HC-UFG) 77 grávidas encaminhadas ao pré-natal por apresentarem exames sorológicos para toxoplasmose compatíveis com infecção aguda (presença de IgM positiva ou surgimento de IgG de baixa avidéz em pacientes anteriormente soronegativas). A triagem sorológica foi identificada pela técnica MEIA (*Microparticle Enzime Immunoassay*).

Realizaram-se amniocentese e cordocentese das pacientes, obtendo 50 amostras de líquido amniótico e 65 de sangue fetal. Já dos recém-nascidos foi possível obter 11 amostras de sangue periférico e 12 de líquido, totalizando 138 amostras.

O líquido amniótico, líquido e sangue (fetos e recém nascidos) foram centrifugados a 3000 rpm (marca), por dez minutos, o sedimento e/ou papa de hemáceas, inoculados via intra-peritoneal com seringa de 1 mL em grupos de três camundongos (0,2 mL por animal). Durante o acompanhamento dos animais, o aparecimento de sinais clínicos, tais como eriçamento dos pelos, emagrecimento e letargia, foram considerados como indicadores de infecção, sendo estes sacrificados por deslocamento cervical e então realizado lavagem peritoneal nestes animais a procura das formas taquizoítas.

Nos camundongos que não apresentaram sinais aparentes de infecção após 60 dias da inoculação inicial, coletou-se o sangue, por punção cardíaca dos animais, sendo esses, sacrificados e necropsiados. Do sangue dos grupos com e sem infecção, após a obtenção do soro, realizou-se sorologia para a detecção de anticorpos da classe IgG e IgM através de IFI. O cérebro foi dividido em duas partes, uma parte macerado e utilizado para 2º repique, outra parte fixada em álcool e posteriormente formolizada com o qual foram confeccionadas lâminas histológicas. O mesmo procedimento acima descrito foi utilizado com os camundongos do segundo inóculo, sendo sacrificados 60 dias pós inoculação.

Utilizou-se a reação de Imunofluorescência Indireta - IFI (Camargo 1974), para detecção dos anticorpos anti-*T. gondii*, o antígeno utilizado foi à cepa RH, mantida no laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia dos protozoários de interesse humano do IPTSP-UFG. A IFI foi realizada com os soros em diluição seriada, a partir de 1:5 para detecção de IgM e 1:10 para IgG. Foi usado conjugado na diluição de 1:200 para o conjugado anti-IgM e anti-IgG, (Anti-cadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA).

As lâminas para análise histopatológica foram confeccionadas de fragmentos do cérebro com espessura de 5 mm e fixados em álcool 70% por 24h e transferidos para o formol tamponado a 10%, foram desidratados em bateria crescente de álcool, diafanizados em xilol e impregnados e emblocados em parafina quente. Foram realizados dez cortes histológicos com 5 µm de espessura em cada experimento. A coloração empregada foi a hematoxilina eosina-HE (Junqueira 1983).

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal sendo protocolado no CEOMHA/HC/UFG sob o nº 039/02, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das doadoras do material do estudo, estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

RESULTADOS

Das 138 amostras obtidas, 115 eram das gestantes (65 de sangue fetal e 50 de líquido amniótico) e 23 de recém-nascidos (11 de sangue periférico e 12 de líquido cefalorraquidiano).

Foi possível isolar o parasito através do exsudato peritoneal em apenas 3,6% (5/138) das amostras, sendo duas de sangue fetal, duas de Líquido Amniótico (LA) e uma do sangue periférico de RN. Os soros e encéfalos obtidos dos camundongos inoculados com as outras 133 amostras restantes foram analisados através da IFI e HE respectivamente, para confirmação de infecção.

Através da IFI, no sangue obtido dos camundongos do 1º inóculo foi possível detectar 50,4% (67/133) de positividade sorológica e no sangue obtido no 2º inóculo 47,4% (63/133).

Pela histopatologia dos encéfalos de camundongos do 1º inóculo, o parasito foi encontrado em 22,6% (30/133) das amostras, nas laminae do 2º inóculo, 13,5% (18/133) de positividade, sendo que três desses foram detectados no 1º e 2º inóculo obtendo um total de 33,8% de casos positivos.

Em todos os camundongos que foram positivos pela histopatologia, a infecção foi confirmada pela IFI, e em 13,0% (18/138) a infecção foi detectada somente pela IFI, demonstrando assim maior positividade.

Os animais inoculados com líquido mostraram maior porcentagem de soroconversão sendo detectado anticorpos antitoxoplasma em 66,6% (8/12) das amostras. Em seguida, o líquido amniótico apresentou identificação dos parasitos em 56,0% (28/50), Sangue fetal teve 43,1% (28/65) de positividade e o sangue do recém-nascido com 27,3% (3/11).

No que diz respeito à detecção do parasito em cortes histológicos no encéfalo dos animais, esse foi observado em 36,9% (24/65) das amostras de sangue fetal, 33,3% (4/12)

de líquido, 30,0% (15/50) de líquido amniótico e 18,2% (2/11) de sangue de recém nascidos (Tabela 1).

Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis.

DISCUSSÃO

Apesar da sorologia ser eficaz em 89,5% nas grávidas (Denmark & Chessum 1978, Sounis 1979, Pratlong et al. 1994, Camargo 1995), há inespecificidade, quando se refere à confirmação da infecção no feto e/ou recém nascido devido à influência da imaturidade imunológica (Braga & Passerine 1994). Os métodos parasitológicos são essenciais para a solução desses casos, sendo justificada a inoculação do material suspeito por via intraperitoneal em camundongos, com posterior observação do *Toxoplasma* no exsudato peritoneal (Camargo et al. 1989, Kawazoe 1995, Frenkel 1997, Beazley & Egermam 1998, Montoya & Liesenfeld 2004).

Com o tratamento imediato da gestante com suspeita de infecção, há uma redução na carga parasitária e essa metodologia vem apresentando baixa sensibilidade (Hohlfeld et al. 1989, Foulon et al. 1994) conforme pode ser observado nos resultados deste trabalho, onde obteve-se 3,6% (5/138) de positividade através do exame direto com detecção de formas taquizoítas no exsudato peritoneal dos camundongos inoculados. Porém, quando realizada e análise dos camundongos inoculados pela histopatologia encefálica, detectou-se em 33,8% (45/133) dos casos formas do parasito, demonstrando maior positividade.

Quando realizou-se a IFI do sangue dos camundongos houve soroconversão em 50,4% (67/133) das amostras analisadas, confirmando a presença de parasitos no material inoculado, estes dados corroboram com Calvão (2002), que indica a IFI como técnica de escolha para análise sorológica experimental. Além disso, no material analisado deveria haver poucos parasitos, devido ao tratamento prévio realizado nas grávidas e/ou as cepas encontradas apresentavam baixa virulência devido a fatores intrínsecos do parasito que influenciaram o comportamento da infecção experimental evidenciando doença subclínica, dificultando assim a detecção da parasitemia experimental.

O material biológico mais indicado para a detecção de infecção toxoplásmica em recém-nascidos foi o líquido que induziu a soroconversão dos camundongos em 66,6% (8/12) dos casos, quando analisados pela IFI, divergindo com Holliman et al. (1990) que

indica o sangue periférico como o material mais indicado. Enquanto que nos fetos o material mais indicado foi o líquido amniótico com 56,0% (28/50) de casos positivos, resultado este concordante com Holhfeld et al. (1994).

A análise de concordância entre os casos positivos do 1º e 2º inóculo, analisados pela IFI, mostram que em 94,0% (63/67) os resultados foram iguais, mostrando assim que a realização do 2º inóculo é dispensável, pois não acrescenta em termos de diagnóstico. Já a mesma análise de concordância entre os casos positivos do 1º e 2º inóculo, analisados pela histopatologia (HE), mostram que apenas em 7,7% (3/39) são concordantes, indicando que o 2º inóculo é importante, pois aumenta substancialmente a sensibilidade do teste.

A IFI em sangue de camundongos mostrou-se mais eficiente que a histopatologia experimental que por sua vez apresentou resultados mais promissores que os apresentados pelo inóculo em camundongos, podendo ser assim indicados como metodologia paralela a inoculação experimental.

O material biológico mais indicado para o exame de infecção toxoplásmica em recém-nascidos foi o líquido cefalorraquidiano e em fetos foi o líquido amniótico.

Os resultados apresentados no 2º inóculo pela IFI não acrescentaram em termos diagnósticos sendo assim dispensáveis sua realização, reduzindo significativamente o número de animais por ensaio. Já pela histopatologia os resultados do 2º inóculo acrescentaram a sensibilidade do teste, sendo assim indicado sua realização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Amendoeira MRR, Da Costa T, Spalding SM 1999. *T. gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. *Rev Souza Marques* 1(1): 15-35.
2. Avelino MM 2000. *A gestação como fator de risco para a primo-infecção pelo Toxoplasma gondii*. Tese, Universidade de Brasília, Brasília, 271 pp
3. Avelino MM 2003, Campos Jr. D, Prado JB, Castro AM. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *Euro J Obst and Gynecol and Reprov Biology* 108(1): 19-24.

4. Beazley DM, Egerman RS 1998. Toxoplasmosis. *Semin. Perinatol* 22(4): 332-338.
5. Braga LFCO, Passerine IGA 1994. Cordocentese. *Ginecol. Obstet. Atual* 3(6): 99-112.
6. Calvão AD 2002. *Manifestações oftalmológicas na toxoplasmose congênita*; monografia, curso de medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói.
7. Camargo ME 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Pat Clin* 10: 87-107.
8. Camargo ME 1995. Alguns aspectos atuais do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. *An Acad Nac Med* 155: 236-239.
9. Camargo ME, Moura MEG, Leser PG 1989. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 31: 279-285.
10. Cazanave J 1993. Improvement of rDna-based PCR assay to detect *Toxoplasma*. *Prenatal Diagn* 13:543.
11. Coutinho SG, Garcia AP, Amendoeira MRR 1983. Detection of Newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 25 (1): 25-30.
12. Denmark JR, Chessum BS 1978. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of *Toxoplasma* antibody. *Med Lab Scie* 35: 227-232.
13. Desmots G, Couvreur J 1974. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *T N Engl J Med* 290: 1110-1116.
14. Figueiro-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte A 2005. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 27(8): 442-449.

15. Filice GA 1993. Diagnosis of *Toxoplasma* parasite in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31(9): 2327-2331.
16. Foulon W, Naessens A, Derde MP 1994. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Prenatal* 11:57-62.
17. Frenkel JK 1997. Toxoplasmosis. In: Veronesi, R., Foccacic, R. (eds.) *Tratado de infectologia*, Atheneu, São Paulo p. 1290-1305.
18. Friedman S, Ford-Jones LE, Toi A, Ryan G, Blaser S, Chitayat D 1999. Congenital toxoplasmosis: prenatal diagnosis, treatment and postnatal outcome. *Prenat Diagn* 19:330-333.
19. Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 28(10): 2297-2301.
20. Hitt JA, Filice GA 1992. Detection of *T. gondii* parasite by gene amplification, cells culture, and mouse inoculation. *J Clin Microbiol* 30(12): 3181-3184.
21. Hofflin JM, Remington JS 1985. Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood of a patient with AIDS. *Arch Intern Med* 145: 925-926.
22. Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, MacAleese J 1989. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *Pediatr* 115: 765-769.
23. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331:695-699.

24. Holliman RE, Raymond R, Renton N, Johnson JD 1990. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. *Epidemiol Infect* 112: 399-408.
25. James GS 1996. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *T. gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. *J Clin Microbiol* 34(6): 1572-1575.
26. Junqueira LC 1983. Técnicas Básicas de citologia e histopatologia. 1ª ed. São Paulo.
27. Kawazoe V 1995. *Toxoplasma gondii* In: Neves DPM, Genaro O, Linardi PM. *Parasitologia humana* 9ª Ed. Atheneu, São Paulo, p. 174-187.
28. Kompalic-Cristo A 2004. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98(2): 92-95.
29. Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-76.
30. Pedreira DAL 1995. *Contribuição ao estudo da toxoplasmose congênita*. Dissertação, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
31. Pratlong F, Boulot P, Issert E, 1994. Fetal diagnosis of toxoplasmosis in 190 women infected during pregnancy. *Prenat Diagn* 14: 191-198.
32. Rey 2001. L. Parasitologia. 3º ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 221-234.
33. Santana RM, Andrade FM, Moron AF 2003. Infecções TORCH e gravidez. In: Prado FC, Ramos J, Ribeiro do Valle J (eds). *Atualização terapêutica*. 21ª ed. Artes Médicas, São Paulo p. 1111-1112.
34. Sounis E 1979. Bioestatística, 2ª Edição rev, McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, 230 pp.
35. Spalding SM 2000. *Acompanhamento de gestantes com risco de transmissão de infecção congênita por T. gondii Nicolle & Manceaux, 1909 na região do alto Uruguai*,

- RS, Brasil: diagnósticos e aspectos epidemiológicos*. Dissertação, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
36. Spalding SM, Amendoeira MRR, Ribeiro LC, Silveira C, Garcia AP, Camillo-Coura Léa 2003. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36(4): 483-491.
 37. Vaz AJ, Guerra EM, Ferratto LCC, Toledo LAS, Azevedo Neto RS 1990. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e doença de Chagas em gestantes de primeira consulta em centros de saúde da área metropolitana, Brasil. *Rev S Pub* 24: 373-379.
 38. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J, Fleury J, Quantin C, et al 2004. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatr* 113(6): 1567-1572.
 39. Williams KAB, Scott JM, MacFarlane DE, Williams JM, Eliasjones, TF, Williams H 1981. Congenital toxoplasmosis: a prospective survey in the west of Scotland. *J Infect* 3: 219-229.
 40. Wirden M, Botterel F, Romand S, Ithier G, Bourée P 1999. Intérêt du dépistage en post-partum de la toxoplasmose congénitale après primo-infection maternelle en fin de grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 28: 566-567.
 41. Wong SY, Remington JS 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* 18: 853-862.
 42. Wong SY, Remington JS 1993. Biology of *T. gondii*. *AIDS. PubMed*.7(3): 299-316.

ANEXO I

TABELA I – Diagnóstico da toxoplasmose congênita por inoculação em camundongos de Sangue Fetal, Líquido amniótico, sangue de recém-nascido e Líquor, relacionando com o diagnóstico histopatológico encefálico experimental e IFI experimental.

		SGF n = 65		LA N = 50		SGRN n = 11		LCR n = 12		Total n = 138
		1° Inoc.	2° Inoc.	1° Inoc.	2° Inoc.	1° Inoc.	2° Inoc.	1° Inoc.	2° Inoc.	1° + 2° Inoc.
Isolado	n	2	0	2	0	1	0	0	0	5
	%	4,6	0	4,0	0	0	0	0	0	3,6
HISTO	n	13	13	12	4	2	0	3	1	45
	%	20,0	20,0	24,0	8,0	18,2	0	25,0	8,3	33,8
IFI	n	28	26	28	27	3	3	8	7	67
	%	43,1	40,0	56,0	54,0	27,3	27,3	66,7	58,3	50,4

SgF – Sangue fetal, **LA** – líquido amniótico, **SGRN** – sangue de recém nascido, **LCR** – Líquido cefalorraquidiano, **Isolado** – Parasitos no exsudato peritoneal, **HISTO** – Histopatologia de encéfalo, **IFI** – Imunofluorescência experimental.

P ≥ 0,05 - KW

4.2 – 2º ARTIGO

Estudo anatomopatológico em encéfalos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii*.

Marcos Gontijo da Silva¹, Ruy de Souza Lino Junior², Tatiane Luiza da Costa³, Joanna Darc Herzog Soares⁴, Mariza Martins Avelino⁵, Ana Maria de Castro⁶.

(1) Mestrando em Medicina Tropical na área de Parasitologia do Inst de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP-UFG. (2) Profº. Adjunto da disciplina de Patologia geral no IPTSP-UFG. (3) Mestranda em Medicina Tropical na área de Parasitologia do IPTSP-UFG. (4) Profª. Adjunto da disciplina de Parasitologia do IPTSP-UFG. (5) Profª. Adjunto do departamento de Pediatria e puericultura da Faculdade de Medicina da UFG. (6) Profª. Adjunto da disciplina de Parasitologia e, orientadora desse estudo dentro do PPGMT no IPTSP-UFG.

Autor de correspondência: amaria@iptsp.ufg.br

Laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano do IPTSP-UFG. Rua 235 eq/ 1ª. av. s/n Setor Leste Universitário, Goiânia Goiás –74605-050.

RESUMO

A toxoplasmose está inserida entre as enfermidades mais importantes que afetam o sistema nervoso central, desencadeando sintomas graves e seqüelas muitas vezes irreversíveis. Esse trabalho demonstra quais são as principais alterações anatomopatológicas provocadas pelo *Toxoplasma gondii* em encéfalos de camundongos BALB/c experimentalmente infectados. Foram analisados 51 casos de camundongos que desenvolveram toxoplasmose após infecção experimental por inoculação intraperitoneal de material (sangue, líquido amniótico e líquor) de fetos e recém nascidos provenientes de grávidas com sinais laboratoriais e/ou clínicos de toxoplasmose. Em todos os experimentos onde detectou-se a presença do parasito nos camundongos, detectou-se alterações patológicas nos encéfalos dos animais, porem estas não foram semelhantes, sendo possível à observação de grande polimorfismo nos diferentes experimentos. O edema foi à alteração

mais encontrada sendo detectado em todos os casos. Além disso, foi possível demonstrar processos inflamatórios em 82,4% dos casos e necrose em 64,7%. Corroborando assim com a literatura que descreve o *T. gondii* com causador de graves danos neurológicos em seus hospedeiros

ABSTRACT

Toxoplasmosis this inserted one enters the diseases most important that they affect the central system nerves, unchaining serious symptoms and of sequels many irreversible times. This work demonstrates which is the main experiment histologys alterations provoked by the *Toxoplasma gondii* in encephalitis of BALB/c mice experimentally infect 51 cases of mice that had developed toxoplasmosis after experiment infection for intraperitoneal inoculation of material (blood, amniotic and líquido liquid) of embryos and just born proceeding from pregnant with laboratory signals of toxoplasmosis had been analyzed congenital. All the experiments had shown alterations, to put these had not been similar, being possible the comment of great polymorphic in the different experiments. edema was the alteration more found being found in all the cases, was possible to demonstrate inflammatory processes in 82,4% dos cases and necrosis in 64,7%. thus corroborating with the literature that incriminates the *T. gondii* with causer of strikes damages to its hosts

Palavras chaves: Toxoplasmose, Histopatologia, encéfalos de camundongos.

INTRODUÇÃO

As enfermidades inflamatórias e infecciosas do sistema nervoso central (SNC) representam um importante grupo de doenças no homem. Sinais clínicos graves, muitas vezes incompatíveis com a vida, podem ser determinados por diferentes etiologias. O protozoário *Toxoplasma gondii* é um importante patógeno que determina alta taxa de mortalidade humana.

A evolução clínica da toxoplasmose humana em pacientes imunocompetentes é habitualmente de bom prognóstico e a infecção é, na maioria das vezes, assintomática^{25 30}.

Mas em imunossuprimidos os sinais e sintomas clínicos mais comuns são a linfadenite e febre, acompanhadas por astenia e mialgia¹⁷. Entre as formas sintomáticas, o acometimento neurológico é um dos mais comuns, expressando-se por encefalite ou meningoencefalite, com sintomas inespecíficos¹⁷. O início pode ser marcado por cefaléia, sonolência e mudança de comportamento, com duração variável de dias ou semanas, seguida por coma, convulsões, síndrome piramidal ou cerebelar, paralisias oculares e transtornos psíquicos^{17 6 13 15 27 28}. A encefalite geralmente é difusa e raramente observam-se lesões focais levando a manifestações localizadas^{13 27}.

Os principais sinais anatomopatológicos observados nos encéfalos de seres humanos infectados com *T. gondii*, indicativos de lesão expansiva no sistema nervoso central são: congestão e edema difusos do parênquima encefálico e necrose coagulativa, de tamanho variado, em diferentes estágios de evolução, disseminadas nas substâncias branca e cinzenta²⁶.

Habitualmente, a necrose coagulativa no encéfalo é liquiefativa, como nos infartos, podendo estar associada ou não a hemorragia. Encontra-se também hemorragia com as hemácias dispostas na periferia das lesões e em outros locais do encéfalo²⁶.

Observa-se também infiltrados de macrófagos com restos mielínicos fagocitados, linfócitos e plasmócitos. Em alguns locais a irrigação sanguínea está prejudicada, não permitindo o aporte de monócitos circulantes, por isso, o tecido necrosado não é fagocitado ou eliminado, permanecendo no local, podendo inclusive calcificar-se. Nas áreas em que a necrose aparenta ser mais antiga, distinguem-se halos de edema e hemorragia envolvendo a lesão²⁶.

As lesões mais evidentes da toxoplasmose são as descritas acima, porém a gravidade de cada alteração relatada varia dependendo da virulência da cepa e resposta imunológica individual, podendo ser observados sintomas e lesões diferenciadas em cada indivíduo.

Objetivou-se com esse trabalho, descrever as alterações anatomopatológicas nos encéfalos de camundongos BALB/c inoculados com sangue fetal, líquido amniótico, sangue de recém nascido, líquor e sangue materno provenientes de pacientes com toxoplasmose ativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram encaminhados ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de patologia tropical e saúde pública IPTSP-UFG 155 amostras, sendo 65 sangue fetal, 50 líquido amniótico, 11 sangue de recém nascido, 12 líquido e 17 sangue materno provenientes de grávidas e/ou seus recém nascidos triadas pelo Setor de Ginecologia, Obstetrícia e Pediatria da Faculdade de Medicina da UFG no período de setembro de 2002 a janeiro de 2005, com suspeita de infecção toxoplásmica ativa.

As amostras citadas acima foram centrifugadas a 3000 RPM, por dez minutos, sendo que o sedimento ou papa de hemáceas foram inoculados via intraperitoneal (0,2 mL por animal) com uma seringa de 1 mL em grupos de três camundongos isogênicos BALB-c, machos, com 30g e 30 dias de idade (1º inóculo), obtidos no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Os animais foram acompanhados por 60 dias sendo então sacrificados por deslocamento cervical, realizando a reinoculação de macerado cerebral, via intraperitoneal, em um segundo grupo de três camundongos da linhagem BALB/c (2º inóculo) de acordo com protocolo estabelecido por Rey ²³.

Foram utilizados como controles, um grupo de cinco animais não infectados com a mesma idade e massa corporal dos camundongos utilizados no experimento.

Analisou-se sinais clínicos adquiridos pós inóculo e nos encéfalos foram avaliados a relação massa encefálica/massa corporal, volume, formato dos sulcos e giros.

Os encéfalos dos camundongos foram seccionados com espessura de 5 mm e fixados em álcool 70% por 24h e então transferidos para o formol tamponado a 10%. Em seguida os fragmentos foram processados para a confecção de blocos histológicos segundo Junqueira (1983)¹⁰. Realizou-se 10 cortes histológicos com espessura de 5µm de cada amostra e as lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina-HE¹⁰.

As lâminas foram examinadas ao microscópio de luz (Olympus CX-31), com objetivas de 10, 40, e 100X. Onde se detectou a presença do parasito foram analisados os seguintes processos patológicos: Necrose (NC), Hiperemia (HP), Hemorragia (HM), Edema (E), Inflamação (I).

As alterações patológicas foram classificadas de forma qualitativa e semi-quantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreta com comprometimento de até

25% da área, moderada de 26% a 50% e acentuada acima de 50%. Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal sendo protocolado no CEOMHA/HC/UFG sob o nº 039/02, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

RESULTADOS

Das 155 amostras, foi possível a visualização do parasito nas formas taquizoíta (foto 1), pseudocisto (foto 2) e/ou cístos (foto 3) em 51 (33%). Nas 51 amostras em que se detectou formas do *T. gondii* 15 (29,4%) eram provenientes de líquido amniótico, 23 (45,1%) de sangue fetal, 4 (7,8%) de líquido, 4 (7,8%) de sangue de RN e 5 (9,8%) de sangue materno.

ANÁLISE MACROSCÓPICA

Os principais sinais observados nos animais inoculados com amostras humanas foram: mudanças comportamentais, pelagem eriçada, letargia, discreto aumento de volume abdominal, emagrecimento, anorexia e lacrimejamento. Nos encéfalos dos animais com infecção aparente observou-se aumento discreto do peso e volume, com alargamento dos giros e apagamento dos sulcos. As leptomeninges estavam espessas e turvas.

Os animais controles não apresentaram as alterações clínicas observadas nos animais do experimento. Seus encéfalos mostraram-se aparentemente normais em volume e cor.

ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os achados histopatológicos eram de natureza e intensidade variáveis, distribuindo-se principalmente no tronco encefálico e cerebelo. A análise anatomopatológica demonstrou alterações em diferentes intensidades, tipos e formas, conforme observado na Tabela I.

A alteração patológica mais encontrada foi o edema (foto 4) que esteve presente em 51 (100%) dos casos, seguida de hemorragia no parênquima (foto 6) em 49 (96,10%), hiperemia no parênquima (foto 5) em 47 (92,20%), hemorragia na meninge (foto 7) em 45 (88,20%), inflamação (fotos 8 e 9) em 42 (82,40%), hiperemia na meninge (foto 7) em 36 (70,59%) e necrose coagulativa (fotos 8 e 9) em 33 (64,70%) amostras (Tabela I).

A inflamação e a hemorragia no parênquima foram às alterações acentuadas mais presentes, ambas encontradas em 12 (23,60%) casos. A hiperemia no parênquima foi à alteração moderada mais prevalente, sendo encontrada em 29 (56,90%) dos casos. A hemorragia no parênquima foi à alteração mais encontrada entre as discretas, sendo evidenciada em 21 (41,20%) casos (Tabela I).

**PRANCHA COM FOTOS DAS LESÕES EM ENCÉFALOS DE
CAMUNDONGOS**

- FOTO 4** – **A** - edema perivascular, **B** – formas taquizoítas
FOTO 5 – **A** - hiperemia no parênquima, **B** – formas taquizoítas
FOTO 6 – hemorragia no parênquima
FOTO 7 – **A** – hiperemia na meninge, **B** – hemorragia na meninge
FOTO 8 – **A** – necrose coagulativa, **B** - inflamação
FOTO 9 – **A** – necrose coagulativa, **B** - inflamação

Material Fetal: As alterações patológicas com maior intensidade nos encéfalos de camundongos inoculados com líquido amniótico foram a hiperemia no parênquima, edema e inflamação manifestando-se de forma moderada, sendo que as outras alterações analisadas apresentaram-se de forma discreta. Nos animais inoculados com sangue fetal a necrose coagulativa e inflamação manifestaram-se de forma discreta enquanto as outras apresentaram-se de forma moderada (Tabela II).

Material de recém nascido: As alterações patológicas detectadas com maior intensidade nos encéfalos de camundongos inoculados com sangue de recém nascido foram hemorragia no parênquima e hemorragia na meninge de forma discreta, enquanto a inflamação de forma acentuada e as outras alterações mostraram-se de forma moderada. Nos encéfalos de camundongos inoculados com líquido a hemorragia no parênquima, hemorragia na meninge e edema, apresentaram-se de forma moderada e as demais de forma discreta (Tabela II).

Material de grávidas: As alterações patológicas com maior intensidade nos encéfalos de camundongos inoculados com sangue materno foi à hemorragia no parênquima que se manifestou de forma acentuada enquanto as demais alterações mostraram-se de forma moderada (Tabela II.).

Animais controles: Nos encéfalos dos animais controles, foram observados edema e hemorragia na meninge ambos de forma discreta. As outras alterações não foram encontradas.

O edema na maioria dos casos se apresentava de forma difuso do parênquima encefálico.

Nos 33 casos onde foi encontrada necrose por coagulação, as lesões apresentavam-se de tamanhos variados, em diferentes estágios evolutivos, disseminadas nas substâncias branca e cinzenta. Em algumas áreas havia somente tecido necrótico e em outros, associava-se a áreas hemorrágicas com as hemácias dispostas na periferia das lesões e em outros focos, além da necrose associada ou não à hemorragia, constatavam-se infiltrados de macrófagos com restos mielínicos fagocitados, linfócitos e plasmócitos. Nas áreas em que a necrose aparentava ser mais antiga, distinguiam-se halos de edema e hemorragia, os quais pareciam envolver o tecido necrótico. Alguns vasos apresentavam, infiltrados

predominantemente de mononucleares; outros mostravam nas paredes, exsudato celular de intensidade variável, formado especialmente por mononucleares.

À objetiva de 100X sob imersão na intimidade das áreas necróticas, observou-se fibras com alterações mielínicas, caracterizadas por rarefação por desorganização da mielina, a qual se apresentava parcialmente destruída ou em arranjos concêntricos grosseiros. Ao lado das fibras lesadas havia outras aparentemente sem alterações morfológicas. Em alguns casos havia meningite, mais intensa nos locais em que a pia-máter e a aracnóide recobriam áreas de parênquima necrótico. Nessas regiões, o processo inflamatório se caracterizava por congestão e infiltrado celular constituído predominantemente por mononucleares e com menor número de neutrófilos. Nas demais partes da meninge a inflamação era discreta.

Nas colorações de HE com facilidade, identificavam-se formas livres de taquizoítos e pseudocistos de *T. gondii*, os primeiros mais freqüentes que os últimos. Em poucos casos nas regiões necróticas era possível à detecção de parasitos.

DISCUSSÃO

O *T. gondii* têm sido responsabilizado por infecções humanas com mau prognóstico³⁵. Esta infecção pode ser experimentalmente induzida em animais de laboratório, principalmente camundongos^{4 7 2 11}. Desta forma, a infecção experimental tem ajudado a entender aspectos patológicos e fisiológicos dessa doença, considerada de grande importância para o homem.

As alterações comportamentais e/ou clínicas como, encefalopatia inespecífica, meningoencefalite difusa ou mesmo como lesões expansivas observadas nos animais desse trabalho, podem ser resultado de injúria isquêmica ou anóxica provocada pelo parasito^{12 18 27}. A redução no fornecimento de oxigênio de 25 a 40% do normal em uma zona de penumbra isquêmica é suportada pelo encéfalo por pouco tempo. Reduções maiores levam a morte e lise celular^{1 8 24}.

Segundo Post et al. (1983)²¹, Macedo (1994)¹⁶ e Lazo (1998)¹⁴, a meningoencefalite por *Toxoplasma* localiza-se inicialmente na substância branca e com o evoluir do processo, se estende à substância cinzenta. No presente estudo observou-se lesões igualmente distribuídas na substância branca e cinzenta, indicando que as lesões se encontravam em

fase de desenvolvimento avançada. Neste ensaio as alterações no parênquima encefálico mostraram-se mais freqüentes que nas meninges conforme trabalhos de Navia (1986)¹⁹, Porter (1992)²⁰ e Post (1983)²¹.

Observou-se que em alguns focos necróticos não foi possível a observação de hemorragia o que corrobora com dados da literatura¹⁴ que demonstram a ocorrência deste fato em pacientes com neurotoxoplasmose. Na maioria dos casos analisados, não foi possível a detecção do parasito nas proximidades das lesões concordando com Lazo (1998)¹⁴. As lesões vasculares necrosantes e as trombozes têm sido descritas por Bertoli et al. (1995)³ e Huang e Chou (1988)⁹, na encefalite toxoplásmica, sendo freqüentes e intensas o que poderia explicar o encontro de focos de necrose sem parasitos.

Observou-se que os encéfalos estudados apresentaram lesões em diferentes graus de intensidade e que a sintomatologia originada foram reflexo da sua gravidade e localização. Essas diferenças podem ser oriundas de diferenças intrínsecas das cepas.

Em todos os casos analisados pelo presente estudo, verificou-se edema, dado concordante com a literatura, como primeiro sinal de resposta ao parasito agressor, seguido de hemorragia, hiperemia, inflamação e necrose. Dependendo da localização e extensão da necrose pode levar o indivíduo à morte e/ou causar seqüelas irreversíveis. Os dados desse trabalho sugerem que as alterações são diversificadas, e que desde o edema à necrose, estão diretamente relacionados à presença do parasito, visto que em encéfalos de camundongos normais usados como controle não observou-se as alterações citadas no grupo experimental.

As alterações microscópicas descritas foram consistentes com as relatadas por outros autores em seres humanos^{3 26 27}. Esse estudo confirma a importância do *T. gondii* como causador de lesão ativa e grave no sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bambirra EA, Barbosa AJA. In: Bogliolo Patologia Geral. 5ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1087-1102, 1994.

2. Beazley DM, Egerman RS. Toxoplasmosis. *Seminars Perinatology* 22(4):332-338, 1998.
3. Bertoli F, Espino M, Arosemena JR, Fishback JL, Frenkel JK. A spectrum in the pathology of toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 119:214-224, 1995.
4. Camargo ME, Moura MEG, Leser PG. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 31:279-285, 1989.
5. Couvreur J, Desmonts G, Tournier G, Szusterkac M. Etude d'une série homogène de 210 cas de toxoplasmose congénitale chez des nourissons âgés de 0 a 11 mois et dépistés de façon prospective. *Pédiatric Annals* 31:815-819, 1974.
6. Desguerre I, Pedespan JM, Buissonnière R, Couvreur J, Ponsot G. Toxoplasmose cérébrale acquise chez un enfant non immunodéprimé. *Archives Françaises Pédiatrie* 50:339-342, 1993.
7. Frenkel JK. Toxoplasmose. In: Veronesi R, Foccacic R. *Tratado de infectologia*. Atheneu, São Paulo, p. 1290-1305, 1997.
8. Graham SH, Chen J. Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release. *Journals Cerebral Blood Flow Metabolism* 13:88-97, 1993.
9. Huang TE, Chou SM. Oclusive hypertrophic arteritis as the cause of discrete necrosis in CNS toxoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Human Pathology* 19:1210-1214, 1988.
10. Junqueira LCU. *Técnicas Básicas de citologia e histologia*. 1ª edição, Santos, 1983.
11. Kawazoe V. *Toxoplasma gondii* In: Neves DPM, Genaro O, Linardi PM. *Parasitologia Humana*, 9º Edição, Atheneu, São Paulo, p. 174-187, 1995.

12. Ketz SS. The cerebral circulation. In: Fishman AP, Richards DW. Circulation of the blood: men and ideas. Oxford University Press, New York, p.703-742, 1964.
13. Khan EA, Correa AG. Toxoplasmosis of the central nervous system in non-human immunodeficiency virus-infected children: case report and review of the literature. *The Pediatric Infectious Diseases Journal* 16:611-618, 1997.
14. Lazo JE. Diagnóstico diferencial entre meningoencefalites toxoplásmica e chagásica em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Ênfase às alterações morfológicas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 1995.
15. Lescop J, Brinquini L, Schill H, Soulié D, Sarrazin JL, Cordoliani YS. Encéphalite toxoplasmique diffuse chez un sujet non immunodéprimé. *Journal de Radiologie* 76:21-24, 1995.
16. Macedo V. Toxoplasma. In: Castro LP, Cunha AS, Rezende JM (eds) Protozooses humanas, Fundo Editorial BYK, São Paulo, p. 153-170, 1994.
17. Moron AF, Carvalho FHC, Santana RM. Toxoplasmose. In: Schor N (eds). Guia de obstetrícia. Manole, São Paulo, p. 485-489, 2003.
18. Nakai H, Yamamoto YL., Diksic M. Triple-tracer autoradiograph demonstrate effects of hypoglycemia of rats. *Stroke* 19:764-772, 1988.
19. Navia BA, Petite CK, Gold JWM, Cho E, Jordan BD, Price RW. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Annals of Neurology* 19:224-238, 1986.
20. Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine* 327:1643-1648, 1992.

21. Post DMJ, Chan JC, Hensley GT, Hoffman TA, Moskowitz LB, Lippmann S. Toxoplasma encephalitis in Haitian adults with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical-pathologic-CT correlation. American Journal of Roentgenology 140:861-868, 1983.
22. Remington JS, Mcleod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO (eds). Infectious diseases in the fetus and newborn infant. 5th edition, Saunders Company, Philadelphia, p. 205-346, 2001.
23. Rey, L. *Parasitologia*. 3ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
24. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. Neurology Annals 19:105-111, 1986.
25. Santana RM, Andrade FM, Moron AF. Infecções TORCH e gravidez. In: Prado FC, Ramos J, Ribeiro do Valle J (eds). Atualização terapêutica. 21ª edição, Artes Médicas, São Paulo, p. 1111-1112, 2003.
26. Silva LA, VIEIRA R S, Serafini LN. Toxoplasmose do sistema nervoso central em paciente sem evidência de imunossupressão: relato de caso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 34(5):487-490, 2001.
27. Townsend JJ, Wolinsky JS, Baringer JR, Johnson PC. Acquired Toxoplasmosis. Archives of Neurology 32:335-343, 1975.
28. Triki A, Couvreur J. Les manifestations neuro-méningées de la toxoplasmose acquise. La Tunisie Medicale 49:323-329, 1971.
29. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. Clinical Infectious Diseases 18:853-862, 1994.

ANEXO I

TABELA I. Alterações Anatomopatológicas em 51 encéfalos de camundongos infectados com *T gondii* com 60 dias pós inoculação intraperitoneal.

Intensidade dos processos	I		NC		E		HMM		HMP		HPM		HPP	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Ausente	9	17,6	18	35,3	-	-	6	11,8	2	3,9	15	29,4	4	7,8
Discreta	15	29,4	15	29,4	12	23,5	18	35,3	21	41,2	7	13,7	11	21,6
Moderada	15	29,4	12	23,5	34	66,7	17	33,3	16	31,4	23	45,1	29	56,9
Acentuada	12	23,6	6	11,8	5	9,8	10	19,6	12	23,5	6	11,8	7	13,7
Total de Alt.	42	82,4	33	64,7	51	100	45	88,2	49	96,1	36	70,6	47	92,2

Legenda: **I** - Inflamação, **NC** - Necrose Coagulativa, **E** – Edema, **HMM** - Hemorragia na Meninge, **HMP** - Hemorragia no Parênquima, **HPM** - Hiperemia na Meninge, **HPP** – Hiperemia no Parênquima, **nº** número de casos positivos, **Alt** - Alterações.

$P \geq 0,05$ –KW.

ANEXO II

TABELA II. Intensidade dos processos patológicos gerais em encéfalo de camundongos infectados com *T. gondii* 60 dias pós inoculação.

	LA	SgF	SgRN	LCR	SgM	CN
	n=15	n=23	n=4	n=4	n=5	n=5
Edema	++	++	++	++	++	++
Hemorragia na meninge	+	++	+	++	++	+
Hemorragia no parênquima	+	++	+	++	+++	+
Hiperemia na meninge	+	++	++	+	++	-
Hiperemia no parênquima	++	++	++	+	++	-
Inflamação	++	+	+++	++	++	-
Necrose coagulativa	+	+	++	+	++	-

Legenda: + discreto, ++ moderado, +++ acentuado, LA – líquido amniótico, SgF – sangue fetal, SgRN – sangue de recém nascido, LCR – líquido cefalorraquidiano, SgM – sangue materno, CN – controle negativo.

$P \geq 0,05$ – KW.

5 - CONCLUSÕES GERAIS

- A associação de técnicas parasitológicas complementam e confirmam o diagnóstico de toxoplasmose congênita.
- A sorologia experimental além de aumentar a sensibilidade do método diagnóstico, diminui o tempo de execução e reduz o número de animais utilizados.
- A histopatologia dos encéfalos dos camundongos aumenta a sensibilidade para confirmação da inoculação experimental.
- O *Toxoplasma gondii* está diretamente relacionado com as lesões encefálicas encontradas em seus hospedeiros.
- Em pacientes com toxoplasmose, processos inflamatórios, necrose encefálica e processos hemorrágicos são alterações comumente encontradas, decorrentes da ação do parasito no hospedeiro, sendo observados neste trabalho em encéfalos de camundongos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Alford CA, Stagno S, Reynolds DW 1974. Congenital toxoplasmosis: clinical laboratory and therapeutic considerations with special reference to subclinical disease. *Bul N Y of Acad Med* 50: 160-168.
- 2 Araújo FG 1970. Anticorpos anti-*T. gondii* em doadores de sangue. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 12: 105-111.
- 3 Aspöck H, Pollak A 1992. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scand. J. Infect Dis* 84: 32-37.
- 4 Avelino MM 2000. *A gestação como fator de risco para a primo-infecção pelo Toxoplasma gondii*. Tese de Doutorado em Medicina – Universidade de Brasília, Brasília, 271 pp.
- 5 Avelino MM 2003, Campos Jr. D, Prado JB, Castro AM. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *E J of Obst and Gynecol and Reprod Biology* 108(1): 19-24.
- 6 Barbosa AJA 1988. As técnicas de imunoperoxidase no estudo da etiologia das doenças infectuosas e parasitárias. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 21(1): 1-6.
- 7 Beazley DM, Egerman RS 1998. Toxoplasmosis. *Semin. Perinatol* 22(4): 332-338.
- 8 Bichara CNC 2001. *Perfil epidemiológico da toxoplasmose humana na área metropolitana de Belém/PA*. Serviço de parasitologia do Inst Evandro Chagas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém.
- 9 Braga LFCO, Passerine IGA 1994. Cordocentese. *Ginecol. Obstet. Atua* 3(6): 99-112.

- 10 Breugelmans M, Naessens A, Foulon W 2004. Prevention of toxoplasmosis during pregnancy: an epidemiologic survey over 22 consecutive years. *J Perinat Med* 32(3):211-214.
- 11 Brezin AP, Kasner L, Thulliez P, Lin Q, Daffos F, Nussenblatt RB, Chan CC 1994. Ocular toxoplasmosis in fetus: immunohistochemistry analysis and DNA amplification. *Retina* 14(1): 19-26.
- 12 Brisighelli NA 1998. *Prevalência da Toxoplasmose em gestantes da cidade de Bragança Paulista - São Paulo*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.
- 13 Calvão AD 2002. *Manifestações oftalmológicas na toxoplasmose congênita*. Monografia para o curso de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- 14 Camargo ME, Leser PG., Rocca A 1972. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescents tests. A technique for specific results. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 14: 310-313.
- 15 Camargo ME 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras de Pat Clín* 10: 87-107.
- 16 Camargo ME, Silva SM, Leser PG, Granato CH 1991. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *T. gondii*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33: 213-218.
- 17 Camargo ME 1995. Alguns aspectos atuais do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. *An Acad Nac Med* 155: 236-239.
- 18 Camargo, M. E 1989. Diagnóstico de laboratório da toxoplasmose humana. *Rev. Bras. Anal. Clín* 21(1): 3-11.

- 19 Camargo, M. E 1996. Toxoplasmose In: Ferreira A, Ávila SLM. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro p. 165-173.
- 20 Camargo ME 2001. Toxoplasmose. In: Ferreira & Ávila. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*, Guanabara Koogan, 2ª ed, São Paulo p. 278-287.
- 21 Carmo EL, Póvoa MM, Trindade DB, Machador LD, Mesquita MPM 1997. *Levantamento da prevalência de T. gondii; através de diferentes métodos sorológicos, em um grupo de grávidas e crianças (0-2 anos) da cidade de Belém/PA*. In: Anais do 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia, Salvador p. 107.
- 22 Castilho EA 1976. Na estimation of the incidence of congenital toxoplasmosis in São Paulo city, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 18: 202-205.
- 23 Cazanave J 1993. Improvement of rDna-based PCR assay to detect *Toxoplasma*, *Prenatal Diagn* 13: 543.
- 24 Cazenave J, Forestier F, Bessieres MH, Broussin B, Begueret J 1992. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis, *Prenat Diag* 12(2): 119-127.
- 25 Ceccon MEJ 1997. Imunidade do feto e do recém-nascido, *Pediat* 19: 9-23.
- 26 Conley FK, Jenkins KA, Remington JS 2001. *Toxoplasma gondii*, *Arq. Inst. Biol de São Paulo* 68(1): 13-17.
- 27 Coutinho SG, Garcia AP. Amendoeira MRR 1983. Detection of Newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis in Rio de Janeiro, Brazil, *Rev Inst Med Trop São Paulo* 25(1): 25-30.

- 28 Couvreur J, Desmonts G, Tournier G, Szusterkac M 1984. Etude d'une série homogène de 210 cas de toxoplasmose congénitale chez des nourissons âgés de 0 à 11 mois et dépistés de façon prospective. *Ann Pédiatr* 31: 815-819.
- 29 Couvreur J, Thulliez P, Daffos F 1995. Toxoplasmose. In: Charles D (ed.). *Infecções obstétricas perinatais*, Artes Médicas, Porto Alegre. p. 240-271.
- 30 Daffos F 1988. Prenatal management of 746 pregnancies at risk congenital toxoplasmosis. *New Engl J Med, London* 318(5): 271-275.
- 31 Davidson MG, Lapin MR, English RV, Tompkins MB 1993. A feline model of ocular toxoplasmosis. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci* 34(12): 3653-3660.
- 32 De Vroede M, Dodion J, De Menter F, Piepsz A, Verougstraete C 1979. Congenital toxoplasmosis: late appearance of retinal lesions after treatment. *Acta Paediatr Scand* 68: 767-772.
- 33 Decoster A, Darcy F, Caron A 1992. Anti P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital *Toxoplasma* infection. *Clin. Exp. Immunol* 87: 310-315.
- 34 Denmark JR, Chessum BS 1978. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of *Toxoplasma* antibody. *Med Lab Sci* 35: 227-232.
- 35 Desmonsts G, Daffos F, Forestier F 1985. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1: 500-504.
- 36 Desmonts G 1981. Immunoglobulin M immusorbent agglutination assay for diagnosis of infections diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol* 14: 486-491.
- 37 Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M 1965. Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de linfluence de la cuisson des viandes de

- boucherie sur la fréquence de infection humaine. *Rev Fran Et Clin Biol* 10: 952-958.
- 38 Desmonts G, Couvreur J 1974. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med* 290: 1110-1116.
- 39 Dubey JP, Frenkel JK 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool* 23: 537-454.
- 40 Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA 1998. Structures of *T. gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11(2): 267-299.
- 41 Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK 1970. Characterization of the new fecal form of *T. gondii*. *J Parasitol* 56: 447-456.
- 42 Dubey JP & Lin TL 1994. Acute toxoplasmosis in a gray fox (*Urocyon cinereargenteus*). *Vet. Parasitol* 51(3/4): 321-325.
- 43 Duffy K, Wharton PJ, Johnson J, New L, Holliman RE 1989. Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting *Toxoplasma* specific IgM. *J of Clin Pathol* 42: 1291-1295.
- 44 Dupouy-Camet J, Bougnoux ME, Sousa SL 1992. Comparative value of polymerase chain reaction and conventional biological tests for the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Ann. Biol. Clin* 50: 315-319.
- 45 Eichenwald HF 1959. A study of congenital toxoplasmosis with particular emphasis on clinical manifestations, sequelae and therapy. In: Slim JC. *Human toxoplasmosis*. Copenhagen: Munhsgaard.
- 46 Falangola MF & Petito CK 1993. Choroid plexus infection in cerebral toxoplasmosis in AIDS patients. *Neurology* 43(10): 2035-2040.

- 47 Feldman HÁ, Miller LT 1956. Serological study of toxoplasmosis prevalence. *Am J Hyg* 64: 320-335.
- 48 Figueiro-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA 2005. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet* 27(8): 442-449.
- 49 Foulon W, Naessens A, Derde MP 1994. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Prenatal* 11: 57-62.
- 50 Foulon W 1992. Congenital toxoplasmosis: is screening desirable? *Scand J of infect Dis* 84: 11-17.
- 51 Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B 1999. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am. J. Obstet. Gynecol* 180(2/1): 410-415.
- 52 Frenkel JK, Dubey JK, Miller NL 1970. *T. gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Sci* 167: 893-896.
- 53 Frenkel JK 2002. Toxoplasmose. In: Veronesi R, Focaccia R (eds). *Tratado de Infectologia* Guanabara Koogan, São Paulo. p. 1310-1324.
- 54 Frenkel JK 1973. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology. In: Hammond DM, Long PL (eds). *The Coccidia*. University Park Press, Baltimore. p. 343-410.
- 55 Frenkel JR, Ruiz A, Chichilla M 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Amer J of Trop Med and Hyg* 24: 439-443.
- 56 Frenkel JK 1997. Toxoplasmose. In: Veronesi, R., Focaccic, R. (eds.) *Tratado de infectologia*, Atheneu, São Paulo. p. 1290-1305.

- 57 Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Racimet C 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, *in vivo* and *in vitro* cultures. *Placenta* 19: 545-549.
- 58 Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, Del Castillo F, Juncosa T, Alvar J 1996. Urine sample for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 34(10): 2368–2371.
- 59 Gomes UA 1978. Estudio de las relaciones entre a toxoplasmosis y las perdas fetales. *Bol of Sanit Panam* 85(4): 315-324.
- 60 Grover CM 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 28: 2297-2301.
- 61 Guerina NG 1994. Congenital infection with *T. gondii*. *Pediatr Ann* 23: 138- 151.
- 62 Hall SM 1992. Congenital Toxoplasmosis. *Brit Med As* 305: 291-297.
- 63 Hofflin JM, Remington JS 1985. Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood form a patient with AIDS. *Arch Int Med* 145: 925-926.
- 64 Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P 1989. Fetal toxoplasmosis outcome of pregnancy and infant follow-up after *in utero* treatment. *J Pediatr* 115: 765-769.
- 65 Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Méd* 331: 695-699.
- 66 Holliman RE, Raymond R, Renton N, Johnson JD 1990. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. *Epidemiol Infect* 112: 399-408.
- 67 Hutchinson WM 1965. Experimental transmission of *T. gondii*. *Nature* 206(4987): 961-962.

- 68 Inagaki ADM 1997. Toxoplasmose e gravidez [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- 69 Jacobs L, Remington JS, Melton ML 1960. The resistance of the encysted form of *T. gondii*. *J Parasitol* 46: 11-21.
- 70 Jacobs L & Lunde F 1957. The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs and man. *Public Health. Rep* 72(10): 872-882.
- 71 Jankü J 1923. Pathogenes a pathologická anatomie taknazvaného vrrrozeného kolobomu zluté skvrny v oku normálne velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitu v sítnici. *Cas Lék Ces* 62: 1021-1027.
- 72 Joynson DH, Payne RA, Rawal BK 1990. Potencial role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 43: 1032-1033.
- 73 Junqueira LC, Junqueira LMMS 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. 1^a ed., São Paulo, Santos, 123 pp.
- 74 Kawazoe, V 1995. *Toxoplasma gondii* In: Neves, D. P. M., Genaro, O., Linardi, P. M. *Parasitologia humana*. 9^a Ed. Atheneu, São Paulo. p. 174-187.
- 75 Koppe JG, Loewer-Sieger DH, De Roever-Bonnet H 1986. Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1: 254-256.
- 76 Lappalainen M, Koskela P, Hedman K 1992. Incidence of primary *Toxoplasma* infections during pregnancy in southern Finland: a prospective cohort study. *Scand J Infect Dis* 24 (1): 97-104.
- 77 Lebech M, Joynson DH, Seitz HM 1996. Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 799-805.
- 78 Maciel CJ, Philoreon GR, Leite MSB 1984. Toxoplasmose Congênita. *Rev. Goiana*

- Méd* 30: 167-176.
- 79 Mcauley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Roizen N, Wolters C 1994. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: The Chicago Collaborative Treatment Trial. *Clin. Infect. Dis* 18: 38 – 72.
- 80 McCabe R, Remington JS 1988. Toxoplasmosis; The time has come. [Editorial]. *N Engl J Med* 318: 313-315.
- 81 Naessens A, Jenun PA, Pollak A, Decoster A, Lappalainen A, Vilena I 1999. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. *The J of Ped* 135 (6): 714-719.
- 82 Naspitz, C. K 1985. Mecanismos De Defesa Do Recém-Nascido. In: Farrhat & Kopelman. *Infecções Perinatais*, Atheneu, Rio De Janeiro, p. 3-8.
- 83 Neves JM, Nascimento LB, Ramos JGL, Martins-Costa SH 1994. Toxoplasmose na gestação. *Rev Bras de Ginecol e Obst* 16(6): 197-202.
- 84 Nicole C, Manceaux L 1908. Sur une infection a corps de leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C.R. Acad. Sci* 147: 763 – 766.
- 85 Nóbrega MC 1998. Ocorrência de toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE [Dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.
- 86 Nogueira A 1996. Toxoplasmose – diagnóstico e tratamento. *J Br Med* 71: 38.
- 87 Oliveira JD, Aguiar ME, Pinto JFC 1986. Toxoplasmose congênita: Aspectos epidemiológicos e laboratoriais. *Clin. Pediatr* p. 32-43.
- 88 Pedreira DAL 1995. *Contribuição ao estudo da toxoplasmose congênita* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

- 89 Pinkerton H, Weinman D 1940. Toxoplosmosis infection in man. *Arch Pathol* 30: 374 – 392.
- 90 Pons JC 1995. Congenital toxoplasmosis to fetus of a pre-pregnancy maternal infection. *Press Med, Paris* 24(3): 179-182.
- 91 Remington JS, McLeod R, Desmonts G 1995. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant*. 4th ed. Saunders, Philadelphia. p. 140-267.
- 92 Remington JS, Cavanaugh EN 1965. Isolation of the encysted form of *T. gondii* from human skeletal muscles and brain. *N Engl J Med* 273: 1308-1310.
- 93 Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G 2001. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious diseases in the fetus and newborn infant*. 5th ed. Saunders Company, Philadelphia. p. 205-346.
- 94 Roos T, Martius J, Gross U, Schrod L 1993. Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy: is it possible to simplify the diagnostic procedures? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 22: 277-283.
- 95 Rosa C, Kasaii N, Souza SLP, Guerra JL, Rego AA, Gennari SM 2001. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. *Arq. Inst. Biol. de São Paulo* .68(1): 13-17.
- 96 Sabin AB, Feldman HA 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). *Science* 108: 660- 663.
- 97 Santana RM, Andrade FM, Moron AF 2003. Infecções TORCH e gravidez. In: Prado FC, Ramos J, Ribeiro do Valle J (eds). *Atualização terapêutica*. 21^a ed. Artes Médicas, São Paulo p. 1111-1112.

- 98 Sounis E 1979. Bioestatística, 2^a Ed. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo 230 pp.
- 99 Splendore A 1908. Un nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesioni anatomiche d'une malattiache ricorda in moltoprinti il kalazar dell'uomo: nótapreliminaire pel. *Rev Soc Sci* 3: 109 – 112.
- 100 Stepick-Biek P, Thulliez P, Araújo FG, Remington JS 1990. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 162: 270-273.
- 101 Sternberger L, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG 1970. The unlabeled antibody method of imunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigenantibody complex (Horseradish peroxidaseantihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem* 18: 315.
- 102 Stray-Pedersen B, Jenum P 1992. Economic evaluation of preventive programs against congenital toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infections Diseases* 84: 86-98.
- 103 Stray-Pedersen, B. S 1993. Toxoplasmosis in pregmanancy. *Baillière's Clin. Obstet. Gynaecol* 7(1): 107-137.
- 104 Thulliez P, Daffos F, Forestier F 1992. Diagnosis of Toxoplasma infection in the pregnant woman and the unborn child: current problems. *Scand J of Infect Dis* 84: 18-22.
- 105 Tsunematsu, Y.; Shioiri, K.; Kusano, N 1964. Three cases of lymphadenopathy toxoplasmic with special reference to the application of fluorescent antibody technique for detection of Toxoplasma in tissue. *J. Exp. Med* 34(4): 217-230.
- 106 Van de Vem E, Melchers W, Galama J, Camps W, Meuwissen J 1991. Identification od *T. gondii* infections by BI Gene amplification. *J Clin Microbiol* 29(10): 2120-2124.
- 107 Vaz AJ, Guerra EM, Ferrato LCC, Toledo LAS, Azevedo Neto RS 1990. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e Doença de Chagas em gestantes de primeira

- consulta em Centros de Saúde de área metropolitana, Brasil. *Rev S Pub* 24 (5): 373-379.
- 108 Viotti NMA, Freire RL, Navarro IT, Vidotto O 1995. Avaliação das técnicas de Hematoxilina Eosina, imunofluorescência e peroxidase anti-peroxidase no diagnóstico post-mortem da Toxoplasmose suína. *Semina Cienc. Agric* 16(1): 107-114.
- 109 Wallon M, Dunn D, Slimani D, Girault V, Gay-Andrieu Peyron F 1999. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA/. *Eur J Pediat* 158 (8): 645-649.
- 110 Wilson CB, Remington JS, Stagno S 1980. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics* 66(5): 767-774.
- 111 Wirlden M, Botterel F, Romand S, Ithier G, Bourée P 1999. Intérêt du dépistage en post-partum de la toxoplasmose congénitale après primo-infection maternelle en fin de grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 28: 566-567.
- 112 Wolf A, Cowen D, Paige BH 1939. Toxoplasmic encephalitis .III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan. *Amer J of Pathol* 15: 657-694.
- 113 Wong SY, Hajdu MP, Ramirez R, Thulliez P, McLeod R, Remington JS 1993. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 31: 2952-2953.
- 114 Wong SY, Remington JS 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* 18: 853-862.

7 – ANEXOS

7.1 – ANEXO I

As instruções aos autores para publicação na Rev Memórias do Instituto Oswaldo cruz estão on line na página <http://memorias.ioc.fiocruz.br/>.

As regras para publicação de artigos na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical estão on line na pagina <http://www.sbmt.org.br/revista.htm>.

7.2 – ANEXO II

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal sendo protocolado no CEOMHA/HC/UFG sob o nº 039/02, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)