

EFEITO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS NA REATIVAÇÃO DE TOXOPLASMOSE CRÔNICA MURINA E ALTERNATIVAS DE PREVENÇÃO: PROPOSTA DE ESTUDO e PADRONIZAÇÃO DA CURVA PARASITÊMICA

ALEIXO, Fabiana Santiago¹.; ALVES, Eduardo da Costa.; VASCONCELOS, Fábio de Faria.; HERZOG-SOARES, Joanna D'arc.A.; GARCIA-ZAPATA, Marco Túlio.A.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- Universidade Federal de Goiás
fabialeixomestrado@yahoo.com.br

Palavras-chave: Toxoplasmose, drogas imunossupressoras

1- INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita comum no homem e em muitos outros animais. Os gatos domésticos e outros felídeos atuam como hospedeiros definitivos, e são capazes de disseminar oocistos de *T. gondii* através de suas fezes. A contaminação dos mesmos ocorre após a ingestão de cistos teciduais de animais infectados ou através de oocistos presentes no solo, o qual constitui uma fonte contínua de infecção para humanos e animais (DEVADA *et al.*, 1998). Após ingestão de cistos ou oocistos efetivos pelo hospedeiro intermediário, os parasitas se multiplicam no interior das células em vários tecidos e finalmente formam cistos microscópicos, que podem permanecer viáveis por vários anos, muitas vezes por toda a vida do hospedeiro. Os cistos teciduais se formam predominantemente no tecidos musculares e nervosos, tornando as carnes dos animais infectados em uma potencial fonte de infecção através do carnivorismo (DUBEY *et al.*, 1998).

O *T. gondii* é um parasita que apresenta vasta distribuição geográfica e excepcional resistência, atravessando grandes distâncias (aves migratórias) e persistindo às adversidades ambientais como a variação de temperatura e umidade, permitindo-nos prever que o mesmo apresentaria alta diversidade genética. Porém, surpreendentemente o parasita parece reproduzir-se clonalmente, apresentando uma diversidade genética consideravelmente baixa entre as linhagens de *T. gondii* isoladas (DARDÉ *et al.*, 1992; SIBLEY & BOOTHROYD, 1992; LEHMANN *et al.*, 2000).

Na infecção por *T. gondii*, em indivíduos imunocompetentes, primeiramente ocorre uma breve fase aguda caracterizada pela proliferação de taquizoítas convertida em um estágio latente caracterizado por um lento crescimento de bradizoítas no interior de cistos teciduais, localizados principalmente no cérebro e músculo esquelético (DJURKOVIC-DJAKOVIC *et al.*, 2001). Estes cistos permanecem viáveis presumivelmente por toda a vida do hospedeiro, controlados principalmente pelos mecanismos de imunidade celular (HUNTER *et al.*, 1996). Contudo, se o balanço entre as defesas imunes do hospedeiro e o parasita, sofrerem um desequilíbrio, uma nova proliferação do parasita pode ocorrer levando a uma reativação clínica. Com o surgimento da AIDS e o uso de terapias imunossupressoras intensas para tratamento de doenças malignas ou sistêmicas, bem como, no tratamento pré/pós transplantes de órgãos e tecidos, tem-se estabelecido uma população de indivíduos imunocomprometidos suscetíveis a reativação de patógenos oportunistas, incluindo o *T. gondii* (BERNSTEEN *et al.*, 1999).

2- METODOLOGIA

2.1– Estudo Piloto.

Num primeiro momento foi realizado um estudo piloto para determinar o número máximo de cistos por camundongo, que podem ser inoculados por gavagem, sem causar a morte espontânea dos animais.

Este estudo consistiu de uma curva de parasitemia com a cepa ME 49, seguindo metodologia de GRUJI *et al.*(2005), onde, camundongos estoque com infecção crônica por *T. gondii* estabelecida (mais de 90 dias), foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram os cérebros retirados, cada cérebro foi macerado em 1 ml de salina e então feita a contagem dos cistos. Para isto, 25 microlitros da suspensão de cérebro foram colocados numa lâmina coberta com lamínula e analisada ao microscópio para contagem dos cistos. O número total de cistos no cérebro foi obtido ao multiplicar-se a quantidade encontrada em 100 microlitros por dez.

Uma vez determinada a quantidade de cistos, estes foram inoculados, via gavagem, em grupos de 5 camundongos balb-c machos com média de idade de 40 dias, onde cada grupo recebeu: 5, 10, 15, 20 ou 30 cistos por camundongo. Os animais foram observados diariamente durante 60 dias, objetivando-se saber a maior quantidade de cistos que promovesse infecção crônica, sem causar morte espontânea.

Estes camundongos foram fornecidos pelo biotério do IPTSP-UFG e sacrificados pelo método de deslocamento cervical após 60 dias, caso não ocorra morte espontânea. Oportunamente, foi retirado o soro para IFI, visando a demonstração da real infecção e seus níveis e reinoculação do cérebro para manutenção da cepa.

2.2- Drogas e regimes imunossupressores:

As drogas imunossupressoras selecionadas são: Azatioprina, ciclosporina, além de, acetato de hidrocortisona e dexametasona. Estas drogas, bem como os regimes de administração foram selecionados por refletirem os protocolos de tratamento mais frequentes usados em transplantes de órgãos (BARRY 1992). Soma-se a isto, o fato dos corticóides permanecerem como tratamento de linha de frente para rejeição aguda e terem sido relacionados com a supressão da imunidade antitoxoplásmica estabelecida em modelos animais (STAHL *et al.* 1966; FRENKEI *et al.* 1975).

Objetivando avaliar a eficácia e possíveis problemas de seu uso como método preventivo para reagudização da infecção, um lote de camundongos receberá a terapia antitoxoplásmica padrão, representada por: Sulfadiazina, Pirimetamina e Ácido fólico.

2.3 – Estabelecimento de infecção crônica

Uma vez conhecido o número de cistos apropriado para desenvolvimento da infecção crônica (estudo piloto), camundongos balb-c machos com média de 40 dias, serão inoculados com cistos da cepa ME 49 de *Toxoplasma gondii*. Esta cepa tem sido utilizada com frequência quando deseja-se estabelecer infecção crônica por *T. gondii* (ARAÚJO *et al.* 1992, DJURKOVIC-DJAKOVIC *et al.*, 2001, GRUJI *et al.*, 2005), por pertencer ao tipo II, tendo um comportamento cistogênico e estando relacionada a 65% dos casos de toxoplasmose clínica em pacientes com AIDS

(HOWE AND SIBLEY,1995). Após 90 dias, considera-se que a infecção crônica já esta estabelecida (GRUJI *et al*, 2005).

Posteriormente, estes camundongos serão divididos em 2 lotes com 9 grupos de 15 animais cada. No primeiro lote cada grupo será submetido ao tratamento com uma droga ou a combinação de drogas imunossupressoras usadas em protocolos estabelecidos para tratamento pós-transplante, seguindo a posologia padrão. No segundo lote cada grupo receberá além do tratamento imunossupressor, o tratamento antitoxoplásmico padrão. Sendo observada a seguinte disposição:

Lote.1- GRUPO: **A.** dexametasona, GRUPO :**B.** acetato de hidrocortisona, GRUPO: **C.** acetato de hidrocortisona + dexametasona, GRUPO: **D.** azatioprina, GRUPO: **E.** ciclosporina, GRUPO:**F.** azatioprina + acetato de hidrocortisona, GRUPO:**G.**azatioprina + dexametasona, GRUPO:**H.** ciclosporina + dexametasona, GRUPO: **I .**ciclosporina + acetato de hidrocortisona.

Lote.2-Grupos submetidos ao tratamento acima com a associação da terapia antitoxoplásmica

CONTROLES:Serão dividido em três lotes

Lote.1- Camundongos infectados e tratados com uma substância inócua

Lote.2- Camundongos não infectados e tratados com terapia imunossupressora

Lote.3- Camundongos infectados e tratados com terapia antitoxoplásmica

Os animais serão tratados por aproximadamente 20 dias de acordo com protocolo e observados por mais 40, posteriormente serão sacrificados ,tendo os órgãos retirados para análise histopatológica

2.4 - Observação dos animais :

Todos os animais, tratados ou não, serão observados diariamente e no 20º, 30º e 40º dia após inicio do tratamento, será aleatoriamente retirado um camundongo do grupo, seu soro e órgãos retirados para respectivos acompanhamentos sorológico e histopatológico. Aqueles que apresentaram morte antes do final dos experimentos terão seus órgãos (fígado, pulmão e cérebro) retirados para analise histopatológica no mesmo procedimento dos outros inoculo.

2.5- Estudo sorológico e histopatológico:

O estudo sorológico dos camundongos objetivará a busca de anticorpos antitoxoplasma das classes Igg e igm, bem como seus respectivos títulos e será feita através da Reação de Imunofluorescência indireta segundo CAMARGO(1973).

Os órgãos, por sua vez, serão analisados histopatologicamente, para isto, as amostras do cérebro,pulmão e fígado serão retirados e armazenados em formol, em seguida passaram por bateria crescente de álcool para desidratar, serão, diafanizados em xilol, impregnados e emblocados em parafina quente.

Posteriormente foram confeccionados cortes com 5 Micrômetros de espessura, este serão então corados com hematoxilina eosina (HE).

Serão realizados dez cortes histológicos do material em cada experimento com o objetivo de detectar processos histopatológicos causados pelas drogas ou pelo parasito.

3- OBJETIVOS:

Visando avaliar a possibilidade de reativação da toxoplasmose crônica em modelo murine, sobre a ação de medicamentos imunossupressores e suas possíveis conseqüências,neste trabalho tem-se como objetivos:

- Avaliar o potencial risco de reativação da toxoplasmose seguido a administração de terapia imunossupressiva

- Identificar, dentro dos esquemas terapêuticos selecionados, a droga ou combinação de drogas com maior potencial de reativação do toxoplasma com uso de cepa com comprovado potencial cigotênico e de grande incidência em infecções humanas.
- Avaliar a utilidade da terapia antitoxoplásmica padrão, na prevenção de possível reativação por consequência de terapia imunossupressora.
- Determinar possíveis mudanças no curso natural da infecção associada a terapia imunossupressora.

4- RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÃO:

Em estudo piloto foi realizada curva de parasitemia com a cepa ME 49 objetivando determinar a quantidade máxima de cistos inoculados para infecção crônica sem morte do camundongo. Foram inoculados 7, 15, 20 e 30 cistos por gavagem em grupos de 5 camundongos cada, sendo os camundongos observados por 40 dias. Nos inóculos de 7, 15 e 20 cistos não houve morte, no inóculo de 30 cistos, houve morte em 12 dias, mostrando a impossibilidade do uso deste.

O conhecimento do número máximo de cistos que pode ser inoculado sem causar a morte espontânea do camundongo é importantíssimo quando se deseja estabelecer um estudo de infecção crônica por *T. gondii*, pois mesmo em uma população isogênica de animais existem as respostas individuais a infecção (FERREIRA *et al*, 2001). SUMYUEN *et al* (1996) propõe um número máximo de 18 cistos por camundongo, enquanto DJURKOVIC-DJAKOVIC *et al* (2001) propõe um número limite de 22 cistos. Em nosso estudo o inóculo de 20 cistos, foi o que apresentou o melhor desempenho, visto que permitiu a infecção dos animais, obtendo uma taxa de mortalidade zero.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARAÚJO, F.G.; PROKOCIMER, P.; LIN, T.; REMINGTON, J.S. Activity of Clarithromycin Alone or in Combination with Other Drugs for Treatment of Murine Toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother.* V 36(11), p 2454-7. 1992.

BARRY, JM .Immunosuppressive drugs in renal transplantation. A review of the regimens. *Drugs*, v 44, p. 554–566. 1992.

BERNSTEEN, L.; GREGORY, C. R.; ARONSON, L. R.; LIRTZMAN, R. A.; BRUMMER, D. G. Acute toxoplasmosis following renal transplantation in three cats and a dog. *J. Am. Vet. Med. Ass.* V 215, p 1123-1126. 1999.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.10, p.143-71, 1973.

DARDÉ, M.L. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Cur. Top. Mic. and Immunology.* V 219, p 27-41, 1992.

DEVADA, K.; ANANDAN, R.; DUBEY, J.P. Sorologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras, Índia. *J. Parasitol.* v 84(3): p 621-622, 1998.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; MILENKOVIC, V. Murine Model of Drug-induced Reactivation of *Toxoplasma gondii*. *Acta Protozool.* v 40, p 99 – 106, 2001.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* v 11, p 267-99, 1998.

FERREIRA, A.M.; MARTINS, M.S.; VITOR, R.W.A. Virulence for balb-c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and human in Brazil. *Parasite.* V 8, p 99-105. 2001.

FRENKEL, J.K.; NELSON, B.M.; ARIAS-STELLA, J. Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis. *Hum. Pathol.* V 6, p. 97–111. 1975

GRUJIĆ, J.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, J.; NIKOLIĆ, A.; IKLUN, I.; BOBIĆ. Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. *International Journal of Antimicrobial Agents.* v 25, p 226-30. 2005.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasites genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* v 172, p 1562-66. 1995.

HUNTER, C. A.; SUZUKI, Y.; SUBAUSTE, C. S.; REMINGTON, J. S. Cells and cytokines in resistance to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* V 219, p 113-125. 1996.

LEHMANN, T.; BLACKSTON, C.R.; PARMLEY, S.F.; REMINGTON, J.S.; DUBEY, J.P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and house keeping genes. *J. Parasitol.* V 86, p 960-71, 2000.

SUMYUEN, M. H.; GARIN, Y.J. F.; DEROUIN, F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol Res.* V. 82, P 681–686. 1996.

SIBLEY, L.D.; BOOTHROYD, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* V 359, p 82-85, 1992.

STAHL, W.; MATSUBAYASHI, H.; AKAO, S. Modification of subclinical toxoplasmosis in mice by cortisone, 6-mercaptopurine and splenectomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* V 15, p 869–874. 1966.

¹Mestranda do Instituto de Patologia Tropical e Saúde
Pública IPTSP, fabialeixomestrado@yahoo.com.br

²Orientador/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- IPTSP