

ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE POSSÍVEL ATIVIDADE DA VIOLETA DE GENCIANA NA PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO DA TOXOPLASMOSE POR TRANSFUSÃO DE SANGUE

Pedro Luiz Silva PINTO (1), Vicente AMATO NETO (2), Maria Irma Seixas DUARTE (3), José Xavier COTRIM (4), Antonio Augusto Baillot MOREIRA (5), Eunice José de SANT'ANA (1) e Rubens CAMPOS (6)

R E S U M O

Devido a evidências sugestivas da possibilidade de transmissão da toxoplasmose por transfusão de sangue, os autores se propuseram avaliar o papel preventivo da violeta de genciana, à semelhança do que já é estabelecido para a doença de Chagas. O experimento em camundongos revelou a ação profilática da violeta de genciana quando adicionado ao sangue a ser transfundido na concentração de 1/1000 e permanência por 48 horas na geladeira.

I N T R O D U Ç Ã O

Existem evidências sugestivas da possibilidade de transmissão da infecção pelo *Toxoplasma gondii* através da hemoterapia^{6,2,10,14}. A propósito, salientamos a parasitemia, observada experimentalmente e também no homem, sobretudo no estágio agudo da doença, mesmo em pacientes clinicamente assintomáticos e que pode permanecer por muitos meses^{3,6,7,9,5}. Deve ser lembrado que tal protozoário já foi demonstrado no sangue de doadores assintomáticos^{1,2,6} e que os trofozoítos do toxoplasma sobrevivem em sangue humano citratado por até 50 dias^{4,14}. Há relatos de que pacientes submetidos à terapia imunossupressora adquirem toxoplasmose através da transfusão de leucócitos^{11,12}. Configura-se, portanto, o risco de aquisição da doença, através de transfusão de sangue total ou de seus derivados, com

maior gravidade para os pacientes com doenças malignas ou em terapia imunossupressora.

Microrganismos presentes, transitória ou duradouramente, no sangue de indivíduos que podem tornar-se doadores, de modo geral são aptos a motivarem infecções nos receptores. Dentre estes, os mais em foco são aqueles responsáveis pela doença de Chagas, hepatites por vírus B, não A não B, malária e a sífilis, mas é imperioso não esquecer de outros, particularmente o *T. gondii*. Além disso, convém recordar que não é impossível o comparecimento, a Serviços de Hemoterapia, para doação, de indivíduos com toxoplasmose inaparente ou oligossintomática, recentemente adquirida.

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Laboratório de Investigação Médica — Parasitologia

- (1) Biomédico. Membro do Laboratório de Investigação Médica — Parasitologia
- (2) Professor-titular de Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Faculdade de Medicina. Chefe do Laboratório de Investigação Médica — Parasitologia
- (3) Professora-assistente-doutora de Patologia, da Faculdade de Medicina
- (4) Técnico de Laboratório, pela Faculdade de Medicina
- (5) Professor-assistente-doutor de Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Faculdade de Medicina. Membro do Laboratório de Investigação Médica — Parasitologia
- (6) Professor-titular de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Membro do Laboratório de Investigação Médica — Parasitologia

A adição de violeta de genciana ao sangue de doadores para eliminação do *Trypanosoma cruzi* é, desde há muito, recurso consagrado no que tange à profilaxia da veiculação transfusional desta protozoose⁸. Considerando que esta tática já merece utilização efetiva, interpretamos como conveniente tentar verificar se ela é capaz de opor-se à contaminação hemoterápica da infecção toxoplasmótica.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos albinos, com dois meses de idade e aproximadamente 25 g, procedentes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram distribuídos em oito grupos experimentais (I a VIII).

Cada grupo era constituído por 12 animais, sendo cada camundongo inoculado por via intraperitoneal com 0,5 ml de sangue humano associado ou não a determinados componentes, conforme especificações abaixo:

Grupo I: sangue, 50.000 trofozoítos de *T. gondii*, violeta de genciana 1/1 000, permanência por 24 horas na geladeira.

Grupo II: sangue, 50.000 trofozoítos de *T. gondii*, violeta de genciana a 1/1 000, permanência por 48 horas em geladeira.

Grupo III: sangue, 50.000 trofozoítos de *T. gondii*, violeta de genciana 1/4 000, permanência de 24 horas na geladeira.

Grupo IV: sangue, 50.000 trofozoítos de *T. gondii*, violeta de genciana 1/4 000, permanência por 48 horas em geladeira.

Grupo V: sangue, 50.000 trofozoítos de *T. gondii*, permanência por 24 horas na geladeira.

Grupo VI: sangue, 50.000 trofozoítos de *T. gondii*, permanência por 48 horas na geladeira.

Grupo VII: sangue, violeta de genciana 1/4 000, permanência por 24 horas na geladeira.

Grupo VIII: sangue, permanência por 24 horas na geladeira.

Ao sangue adicionou-se CPD (citrato, fosfato e destrose), costumeiramente utilizado em Serviços de Hemoterapia, sendo o mesmo estocado em geladeira à temperatura de 4°C.

Os trofozoítos foram obtidos à partir do líquido peritoneal de camundongos inoculados

previamente com a cepa N de *T. gondii*, conforme metodologia descrita por SILVA & CARMARGO¹³.

A violeta de genciana, fornecida pela Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas (Violeta de genciana 0,5 g, solução de glicose a 5% em água destilada, q.s.p. 100 ml) de procedência alemã, adquirida da firma "Labormax".

Seis animais de cada grupo foram sacrificados com 3, 6 e 15 dias após o início do experimento, sendo então feita a pesquisa de parasitas no líquido peritoneal e colhido fragmentos teciduais de fígado, pulmão e sistema nervoso central para exame histopatológico. Os fragmentos de tecido foram processados pelos métodos habituais para obtenção de preparados histológicos, os quais foram corados pela hematoxilina-eosina.

Os demais animais de cada grupo (6) foram acompanhados para a observação de mortalidade, por um período de até 30 dias, procedendo-se à procura de parasitas no líquido peritoneal naqueles que iam a óbito.

Os animais infectados que sobreviveram após os 30 dias foram então sacrificados, efetuando-se a pesquisa de parasitas no líquido peritoneal e colhido os fragmentos de tecido para exame histopatológico. Com o extrato de cérebro desses animais sobreviventes foram feitas subinoculações em outros camundongos (dois para cada grupo) sendo estes sacrificados após dez dias de observação. Neles foram pesquisados parasitas no líquido peritoneal e colhidos fragmentos de fígado, pulmão e sistema nervoso, para exame histopatológico.

RESULTADOS

Na Tabela I estão expressos os resultados da pesquisa de parasitas no líquido peritoneal e nos tecidos, assim como as alterações histopatológicas específicas; na Tabela II estão registrados os dados de mortalidade.

Os camundongos dos grupos V e VI (infectados pelo *T. gondii* e não submetidos a ação da violeta de genciana) revelaram, quando sacrificados, a presença dos parasitas no líquido intraperitoneal e nos tecidos. Além disso, exibiram lesões parenquimatosas hepáticas extensas.

T A B E L A I

Estudo experimental sobre a atividade da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da toxoplasmose por transfusão de sangue: pesquisa de parasitas no líquido peritoneal, nos tecidos e alterações histopatológicas

Grupos	Concentração da violeta de genciana	Período de contato com sangue e permanência na geladeira	Número de parasitas inoculados	Presença de parasitas no líquido peritoneal	Identificação dos parasitas no fígado	Hepatite toxoplasmótica	Pneumonite intersticial	Lesões do sistema nervoso central
I	1/1000	24 horas	5x10 ⁴	ausente	0	0	0	0
II	1/1000	48 horas	5x10 ⁴	ausente	0	0	0	0
III	1/4000	24 horas	5x10 ⁴	presente no 6.º dia após inoculação	+	++	0	0
IV	1/4000	48 horas	5x10 ⁴	presente no 6.º dia após inoculação	+	++	0	0
V	—	24 horas	5x10 ⁴	presente no 3.º dia após inoculação	+	+++	0	0
VI	—	48 horas	5x10 ⁴	presente no 3.º dia após inoculação	+	+++	0	0
VII	1/4000	24 horas	—	—	0	0	0	0
VIII	—	24 horas	—	—	0	0	0	0

T A B E L A II

Estudo experimental sobre a atividade da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da toxoplasmose por transfusão de sangue: mortalidade

GRUPOS	Número de animais em cada grupo	Número de animais mortos após inoculação										Mortalidade até 30 dias (%)
		dias										
		6.º	7.º	8.º	9.º	10.º	11.º	12.º	13.º	14.º	30.º	
I	6	—	—	—	—	—	—	—	1	—	2	50
II	6	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	17
III	6	—	—	2	3	1	—	—	—	—	—	100
IV	6	—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	67
V	6	—	5	1	—	—	—	—	—	—	—	100
VI	6	—	—	6	—	—	—	—	—	—	—	100
VII	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
VIII	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0

Estas eram representadas por áreas de necrose dos hepatócitos que eram circundadas por infiltrado mononuclear com numerosos parasitas fagocitados por macrófagos. O infiltrado mononuclear também comprometia os espaços portais, onde o parasitismo era pouco frequente. As células de Kupffer estavam hipertrofiadas e hiperplasiadas e por vezes fagocitando o toxoplasma (Fig. 1). O envolvimento pulmonar restringiu-se à ocorrência de pequenos focos de infiltrado mononuclear septal e/ou peribrônquico, não tendo sido notado parasitismo. Não foram observados quaisquer alterações no sistema nervoso central. Todos os animais desses grupos quando observados em relação a mortalidade, foram a óbito entre o 7.º e 8.º dias, denotando a gravidade da infecção, assim transmitida.

A adição ao sangue de violeta de genciana na concentração de 1/4 000 (grupos III e IV) não alterou significativamente o comportamento da infecção, pois os parasitas estiveram presentes no líquido intraperitoneal e nos tecidos. No entanto a hepatite toxoplasmótica apresentou menor intensidade com lesões necróticas, menos extensas e parasitismo mais baixo.

A mortalidade nesses grupos também foi muito elevada, 100% e 67%, respectivamente, embora ocorrendo entre o 8.º e 10.º dias para o grupo III (tempo de contato com a violeta de 24 horas) e entre o 10.º e 12.º dias para o

grupo IV (tempo de contato com a violeta de 48 horas).

A concentração de violeta de genciana de 1/1 000, 24 ou 48 horas de contato (grupos I e II) determinou o desaparecimento dos parasitas no líquido intraperitoneal e nos tecidos, não ocorrendo também as lesões hepáticas agudas graves que caracterizaram a hepatite toxoplasmótica. No fígado foram encontrados apenas discreto infiltrado mononuclear portal e hipertrofia e hiperplasia discreta e difusa das células de Kupffer. O acompanhamento por 30 dias desses animais mostrou mortalidade de 50% no grupo I e de 17% no grupo II, representado pela morte de 1 animal no 14.º dia, sendo negativa a pesquisa de parasitas.

As subinoculações de triturado de sistema nervoso a partir de camundongos sobreviventes não determinou alterações no sistema nervoso, fígado ou pulmões, não sendo também detectados parasitas no líquido peritoneal ou nos tecidos (cistos ou pseudocistos).

DISCUSSÃO

A pesquisa que levamos a cabo demonstrou que a violeta de genciana pode, da maneira como foi empregada, e que é semelhante à preconizada para a prevenção da doença de Chagas transfusional, evitar a transmissão da toxoplasmose pela hemoterapia.

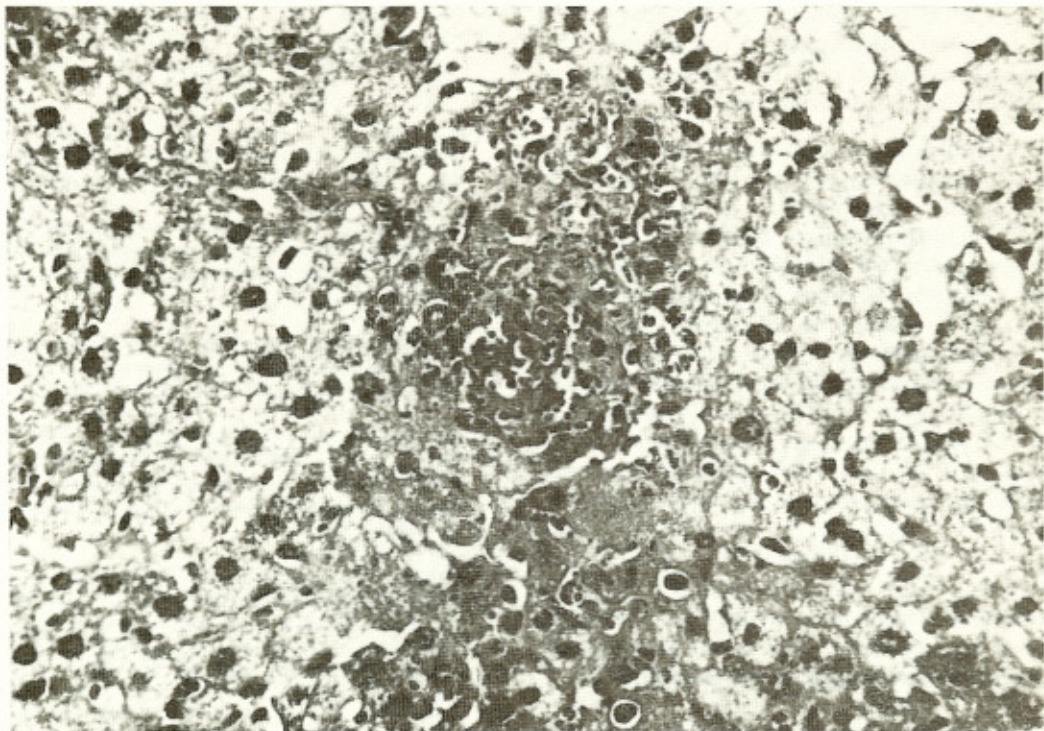


Fig. 1 — Hepatite toxoplasmótica: necrose de hepatócitos, infiltrado mononuclear e parasitismo de células de Kupffer (240X)

Os camundongos inoculados com sangue e toxoplasma desenvolveram quadro histopatológico de hepatite aguda grave com extensas zonas de necrose do fígado e parasitismo importante. Os parasitas estavam também presentes no líquido intraperitoneal. A mortalidade dos animais foi de 100%, ocorrendo entre o 7.º e 8.º dias, o que reflete a gravidade da infecção assim transmitida.

A violeta de genciana adicionada ao sangue, na concentração de 1/1 000 e respeitada a permanência na geladeira por 48 horas, opôs-se a transmissão da infecção pelo *T. gondii* a camundongos. Os parasitas estavam ausentes no líquido peritoneal e nos tecidos, não sendo observadas alterações hepáticas agudas. O encontro de discreto infiltrado inflamatório portal e discreta hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer devem refletir aspecto reacional hepático ao material inoculado, eventualmente parasitas mortos. A ocorrência de apenas um óbito tardio (14.º dia) após inoculação, a nosso ver não resultou de infecção toxoplasmótica, porque não foram encontrados pa-

rasitas no líquido intraperitoneal ou nos tecidos.

A concentração menor de violeta de genciana (1/4 000) não foi suficiente para proteger os animais da infecção toxoplasmótica, pois os parasitas foram identificados no líquido peritoneal, ocorrendo no fígado hepatite toxoplasmótica específica, se bem que de menor intensidade que aquela observada nos animais inoculados sem a droga.

A apreciação histopatológica dos diferentes grupos não indicou nos pulmões a existência de pneumonite intersticial aguda toxoplasmótica. Nestes órgãos, a presença de discreto infiltrado mononuclear peribrônquico, não tem ligação com a infecção toxoplasmótica ou qualquer outra providência pertinente ao estudo. Tal alteração é vista com frequência, como dependente de procedimentos relacionados com a manutenção dos animais ou de seu próprio comportamento.

O exame do sistema nervoso central não revelou qualquer alteração histopatológica, nem

a presença de pseudocistos ou de cistos teciduais toxoplasmóticos, mesmo nos animais que foram subinoculados com triturado de cérebro de camundongos sobreviventes.

Em face dos conhecimentos até agora disponíveis acreditamos que não está indicada sistematicamente, nos Bancos de Sangue, triagem rotineira de doadores baseada na procura de anticorpos anti-T. *gondii*. Melhor seria reservar a feitura de prova sorológica esclarecedora para a seleção de doadores escolhidos para fornecimento de sangue total ou de seus derivados destinados a doentes imunossuprimidos. Nesses casos seria de grande utilidade a adição da violeta de genciana ao sangue a ser transfundido, face ao risco representado pela aquisição de toxoplasmose por estes pacientes.

SUMMARY

Experimental study on the possible profilitic action of the gentian's violet in the toxoplasma transmission through blood transfusion.

The Authors proposed a study for the evaluation of the prevention of toxoplasmose transmission through blood transfusion by the gentian's violet as has been made for Chagas's Disease. Experiments with mice showed that the gentian's violet added to the blood in the concentration of 1/1 000 kept in refrigerator for 48h prevents the transmission.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO NETO, V.; CAMPOS, R.; FARUZZI, R. G. & DUARTE, M. I. S. — Toxoplasmose. São Paulo, Sarvier S/A Editora de Livros Médicos, 1982.
2. AMATO NETO, V.; COTRIM, J. X.; LAUS, W. C. & GOMES, M. C. O. — Nota sobre o encontro de *Toxoplasma gondii* em sangue destinado a transfusão. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5: 68-69, 1963.
3. HULDT, G. — Experimental toxoplasmosis. Parasitemia in guinea pigs. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 58: 457, 1963.
4. JANITSCHKE, K.; WERNER, H. & HASSE, W. — Untersuchungen über die Möglichkeit der Übertragung von Toxoplasmen durch Bluttransfusionen. *Blut* 29: 407, 1974.
5. KIMBALL, A. C.; KEAN, B. H. & FUCHS, F. — Toxoplasmosis: risk variations in New York City obstetric patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 119: 208-214, 1974.
6. KUNERT, H.; ALEXANDER, M. & THOMASCHEK, G. — Über Anzüchtungen von *Toxoplasma gondii* aus dem Blut von Toxoplasmose-patienten. *Zbl. Bakt.* 208: 110, 1968.
7. MILLER, M. J.; ARONSON, W. & REMINGTON, J. S. — Late parasitemia in asymptomatic acquired toxoplasmosis. *Ann. Intern. Med.* 71: 139, 1969.
8. NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; FREITAS, J. L. P.; AMATO NETO, V.; BIANCALANA, A. & KLOETZEL, J. — Ação de agentes físicos e químicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". *Hospital (Rio)* 45: 589-599, 1954.
9. PRIOR, J. A.; COLE, C. R.; DOCTON, F. L.; SASLAW, S. & CHAMBERLAIN, D. M. — Toxoplasmosis. IV. Report of three cases with particular reference to asymptomatic *Toxoplasma* parasitemia in a young woman. *Arch. Intern. Med.* 92: 314, 1953.
10. RÄISÄNEN, S. — Toxoplasmosis transmitted by blood transfusions. *Transfusion* 18: 329-332, 1978.
11. ROTH, J. A.; SIEGEL, S. E.; LEVINE, A. S. & BERRARD, C. W. — Fatal recurrent toxoplasmosis in a patient initially infected via a leukocyte transfusion. *Am. J. Clin. Pathol.* 56: 601, 1971.
12. SIEGEL, S. E.; LUNDE, M. N.; GELDERMAN, A. H.; HALTERMAN, R. H.; BROWN, J. A.; LEVINE, A. S. & GRAW, R. G. — Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood* 37: 388, 1971.
13. SILVA, L. H. P. & CAMARGO, E. P. — Ação de alguns análogos de purina, em particular o aminonucleosídeo da estilomicina, sobre a toxoplasmose experimental do camundongo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 3: 121-126, 1961.
14. TALICE, R. V.; GURRI, J.; ROYOL, J. & PREZ-MOREIRA, L. — Investigaciones sobre la toxoplasmosis en el Uruguay. Sobrevida de *Toxoplasma gondii* en sangre humana "in vitro". *Ann. Fac. Med. Montev* 42: 143, 1957.

Recebido para publicação em 14/11/1984.