

Cristina da Silva Meira

**Proteínas excretadas/secretadas (ESAs) de
Toxoplasma gondii: emprego no diagnóstico
sorológico da toxoplasmose cerebral em pacientes
com aids**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:

Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chiocola

**SÃO PAULO
2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Meira, Cristina da Silva

Proteínas excretadas/secretadas (ESAs) de *Toxoplasma gondii*:
emprego no diagnóstico sorológico da toxoplasmose cerebral em pacientes
com Aids / Cristina da Silva Meira - São Paulo, 2008.

Dissertação (mestre) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde
de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Vera Lucia Pereira-Chioccola

1. *Toxoplasma* 2. Toxoplasmose cerebral 3. Organelas/secreção
4. Proteínas 5. Testes sorológicos 6. Síndrome de imunodeficiência
adquirida

SES/CCD/CD-192/08

Dedico este trabalho aos meus pais, Aderito e Vera Lúcia
Pelo esforço que fizeram para eu chegar até aqui,
Pela paciência aos meus caprichos,
Pela confiança mesmo sem entender o que faço,
Pelo respeito às minhas decisões,
Pelo amor, carinho e incentivo
Em todos os momentos e sem restrições.
Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À **Prof^a. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola**, pela orientação, dedicação, incentivo e pelos ensinamentos transmitidos nesses anos de convivência, principalmente por acreditar no meu potencial e permitir meu ingresso na pesquisa. Minha gratidão por sempre abrir portas para novos horizontes, pela confiança, pela terna amizade e por fazer parte desta grande conquista.

Às minhas queridas irmãs, **Fabiana** e **Malena**, pelo amor, paciência, compreensão e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos e sempre me fazerem acreditar que *“tudo vai dar certo”*. Amo vocês e sou muito feliz pela família que somos.

Ao **Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto**, pela amizade, apoio, incentivo e principalmente por me transmitir parte de seu conhecimento.

Ao **Dr. José E. Vidal**, do Instituto de Infectologia Emílio Ribas-SP e ao **Setor de Toxoplasmose do Instituto Adolfo Lutz-SP** pela parceria profissional, apoio e fornecimento dos soros para a realização dos experimentos.

Às minhas amigas-irmãs **Thaís Alves** e **Isabelle Martins**, *“companheiras de todas as batalhas”*, pelo convívio, companheirismo e por compartilharem todos os momentos deste projeto. Obrigada pela valiosa amizade e pela oportunidade de me juntar a vocês e fazer parte das *“trigêmeas”* da Biomol.

Ao meu grande amigo, **Fábio Antônio Colombo**, pela amizade e incentivo em todos os momentos. Pelas dicas importantes dadas ao longo dos anos e pelos *“abacaxis que me ajudou a descascar”* desde o início do aprimoramento e, principalmente, por poder contar sempre com sua ajuda.

À **Prof^a Dra. Adriana Pardini Vicentini** (IAL-SP), **Prof^a. Dra. Neuza Satomi Sato** (IAL-SP), e **Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira** (ICB-USP), integrantes da banca de qualificação, e ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto** (IAL-SP) pelas sugestões oferecidas para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de biologia molecular e parasitologia, **Margarete Pereira**, a *“Surucucu”*, **Cida Perez**, **Rafael Tonini**, o *“Garoto Real Time”*, **Débora Picanço**, **Jefferson Rodrigues**, **Simone Aquino**, **Jú Reimão**, **Denise Teixeira** e **Crisinha**, pela amizade e momentos de descontração, pelos botecos e enquetes lançadas no quadro e principalmente pelas *“gargalhadas nossas de cada dia”*. Obrigada meus grandes amigos.

À querida amiga **Aparecida Helena S. Gomes** do Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba/SP, pelo companheirismo nas aulas de pós-graduação e principalmente pela amizade e palavras de incentivo.

À minha amiga de infância **Amanda Roseli**, pelo apoio e compreensão nesta etapa da minha vida. Obrigada por festejar as minhas conquistas e ouvir meus desabafos. Considero-te uma irmã para sempre.

Aos amigos, **Carolina Matos**, **Elaine Corneta**, **Otávio Oliveira**, **Marilena dos Anjos**, **Gabriela Motoie**, **Ana Paula Félix**, **Tamara Guelli**, **Lizandra Nabôas**, **Mariana Teruya**, **Regina Franco** e **Kátia Cabral**, pelos anos de convivência, amizade e torcida. Tenham a certeza de que todos estão no meu coração.

À querida amiga **Emiliana**, da Coordenadoria de Controle de Doenças, por toda a ajuda, amizade e auxílio prestado para a realização deste trabalho.

Às pesquisadoras **Elisabeth Visone**, **Cybele Gargioni** e **Márcia Bisugo**, por acreditarem no meu potencial e permitirem meu ingresso no Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) em Parasitologia, onde tudo começou.

Aos funcionários e aprimorandos das seções de Parasitoses Sistêmicas, Enteroparasitoses e Micologia do 8º andar do Instituto Adolfo Lutz, que contribuíram direta e indiretamente em minha formação acadêmica, pela ajuda, amizade e compreensão.

À Deus

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- 05/03052-5).

Cristina da Silva Meira teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 06/52674-1).

*“Completou-se uma jornada.
Chegar é cair na inércia de um ponto final,
Na euforia da chegada, porém,
Há um convite irrecusável
Para uma nova partida”*

Helena Kolody

RESUMO

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico molecular e sorológico da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids, ainda existem limitações na prática clínica. O tratamento específico é usualmente iniciado através do diagnóstico presuntivo, baseado em achados clínicos e radiológicos. O presente estudo avalia o emprego das proteínas excretadas/secretadas (ESAs) de *Toxoplasma gondii* no diagnóstico sorológico da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids. A escolha do antígeno foi baseada naqueles produzidos por taquizoítos, uma vez que esta forma é responsável pela disseminação da infecção, assim como estimulação da resposta imune celular e humoral. Pelo método de ELISA (ESA-ELISA), o pool de ESAs recuperadas de sobrenadantes de culturas de células VERO infectadas com taquizoítos (cepa RH) 48 horas pós-infecção teve alta especificidade para soros de pacientes com toxoplasmose cerebral. As reações foram comparadas com a ELISA utilizada na sorologia convencional, na qual se emprega como antígeno, um extrato bruto de taquizoítos. Os ensaios foram realizados em 300 amostras de soros divididos em: Grupo I - 106 soros de pacientes com toxoplasmose cerebral e aids (sintomáticos); Grupo II - 99 soros de indivíduos com toxoplasmose crônica (soropositivos), excluindo-se pela suspeita clínica e triagem da Instituição de origem, os soros suspeitos de HIV positivo; e Grupo III - 95 soros de indivíduos sadios sem toxoplasmose (controle). A ELISA convencional não foi capaz de distinguir os Grupos I e II que apresentaram similar reatividade. Em contraste, ESA-ELISA distinguiu soros de pacientes com toxoplasmose cerebral ($p < 0,05$). Estes soros foram três vezes mais reativos do que aqueles de indivíduos soropositivos (médias de 12.6 para 4.2). Os resultados foram confirmados pela concordância com os resultados em western blotting e pela análise estatística. Esses dados sugerem que anticorpos anti-ESAs estão preferencialmente presentes em pacientes com a infecção ativa. Desta forma, ESA-ELISA mostrou ser um método simples para auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids, especialmente em países com elevada prevalência de infecção pelo *T. gondii* na população geral.

ABSTRACT

Despite improvements in serological and molecular methods in recent years, the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients still presents difficulties. In the present study, we investigated whether the cerebral toxoplasmosis induced changes in the reactivity of serum toward *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens (ESA) in order to develop an assay for evaluating HIV-infected patients with cerebral toxoplasmosis. The antigen selection was based on those produced by tachyzoites since it is the form responsible for disseminating the infection as well as stimulation of the humoral and cellular immune responses. By using an ELISA containing a pooled secreted-excreted protein recovered from infected culture supernatants with tachyzoites-RH strain (ESA-ELISA), we found that ESA had a high specificity for sera from patients with cerebral toxoplasmosis. The reactions were compared with an ELISA using a *crude tachyzoites antigen*, widely used in the traditional serology. The assays were performed in 300 serum samples separated in: 106 sera from patients with cerebral toxoplasmosis and aids (symptomatic); 99 sera from individuals with chronic toxoplasmosis (asymptomatic), excluding the suspects serum of positive HIV; and 95 sera from healthy individuals without toxoplasmosis (control). The *crude tachyzoite antigen* in ELISA was unable for distinguishing both groups of sera with toxoplasmosis, as similar reactivity was observed in sera from patients with cerebral toxoplasmosis and those from chronic individuals. In contrast, ESA-ELISA distinguished sera from symptomatic and asymptomatic individuals (three times more reactive in the prior group, means of 12.6 versus 4.2 and $p < 0,05$). The results were confirmed by the concordance with the western blotting results and the statistical analysis. These data suggest the ESA-ELISA utility in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patient since they provided clear evidence that anti-ESA antibodies are present principally in patients with active infection. The absence of a significant amount of antibodies distinguished the patients without clinical symptoms of infection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- aids** – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- CD4+** - Cluster of Differentiation
- CDC** – Centers for Disease Control
- Células NK** – Células “Natural Killer”
- Células VERO** – Células de rim de macaco verde africano
- DNA** - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
- D.O.** - Densidade ótica
- DP** – Desvio Padrão
- EGF** – Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)
- ELISA** – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
- ESAs** – Excreted/secreted antigens (Antígenos excretados/secretados)
- ESA-ELISA** – Ensaio imunoenzimático com ESA
- et al.** – e colaboradores
- g** – Aceleração da gravidade
- GPis** – Pontes de glicosilfosfatidilinositol
- GRA** – Dense granules proteins (Proteínas dos grânulos densos)
- HAART** – Highly active antiretroviral therapy (Terapia anti-retroviral altamente eficiente)
- HIV** – Human immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência humana)
- IFN- γ** - Interferon gamma
- IgA** - Imunoglobulina da classe A
- IgE** - Imunoglobulina da classe E
- IgG** - Imunoglobulina da classe G
- IgM** - Imunoglobulina da classe M
- IL** – Interleucina
- LCR** - Líquido cefalorraquidiano
- MIC** – Micronemal proteins (Proteínas dos micronemas)
- OPD** - Orto-fenilenodiamina
- PCR** - Polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

pH – Concentração de hidrogênio iônico

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

RNM - Ressonância nuclear magnética

ROP – Rhopty proteins (Proteínas das roptrias)

SAG – Surface antigen (Antígeno de superfície)

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
(Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo
dodecil sulfato de sódio)

SFB – Soro fetal bovino

SNC - Sistema nervoso central

SRS – Sequências relacionadas à SAG

TC – Tomografia computadorizada

TGF-β - Transforming growth factor-beta (Fator beta transformador de
crescimento)

Th1 – resposta celular do tipo 1

Th2 – resposta celular do tipo 2

TNF-α – Tumor necrosis factor-alpha (Fator de necrose tumoral alfa)

TRAP – Thrombospondin related anonymous protein (Proteína anônima
relacionada à trobospondina)

UV – Ultravioleta

VR – Valor Relativo

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Página

Tabela 1. Western blotting: Reatividade das frações protéicas nos soros dos grupos I e II.....	77
Figura 1. Taquizoítos (A), cisto com bradizoítos (B) e oocisto esporulado e não esporulado (C).....	21
Figura 2. Vias de transmissão de <i>T. gondii</i>	23
Figura 3. Taquizoíto de <i>T. gondii</i> , ilustrando suas estruturas e organelas....	40
Figura 4. Gel SDS-PAGE 10%, corado por Coomassie Azul Brilhante, contendo amostras de ESAs obtidas a partir de sobrenadantes de culturas celulares infectadas por <i>T. gondii</i> retirados em diferentes períodos.....	62
Figura 5. Gel SDS-PAGE 10%, corado por Coomassie Azul Brilhante, contendo amostras de ESAs obtidas a partir de sobrenadantes de culturas de células infectadas por <i>T. gondii</i> e armazenadas a -20°C por: 1 hora, 1 mês, 2 meses, 4 meses e 6 meses.	62
Figura 6. Gel SDS-PAGE 10%, corado por Coomassie Azul Brilhante, contendo amostras de ESAs obtidas a partir de sobrenadantes de culturas celulares infectadas por <i>T. gondii</i> com inibidores de proteases (A) e sem inibidores de proteases (B) após: 1 hora, 5 dias, 10 dias, 20 dias e 30 dias.....	63
Figura 7. ELISA: análise do tipo de microplaca. As placas de alta (A) e baixa afinidade (B) foram sensibilizadas com as ESAs e incubadas com: 10 soros negativos (amarelo), 10 soros soropositivos (verde) e 10 soros	

com toxoplasmose cerebral (vermelho). Os resultados representam as médias \pm 2DP das D.O.s a 492 nm de 10 soros por grupo.....66

Figura 8. ELISA: análise do pH do antígeno. As placas foram sensibilizadas com as ESAs (diluições seriadas) em tampão citrato pH 4.0 (preto), PBS pH 7.2 (verde), e tampão bicarbonato de sódio pH 8.5 (vermelho). A seguir, foram incubadas com: 10 soros negativos (A), 10 soros soropositivos (B) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (C).....66

Figura 9. ELISA: determinação da concentração de ESAs. As placas foram sensibilizadas com as ESAs (diluições seriadas) em tampão bicarbonato de sódio e incubadas com: 10 soros negativos (amarelo), 10 soros soropositivos (verde) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho). Os resultados representam as médias \pm 2DP das D.O.s a 492 nm de 10 soros por grupo.....67

Figura 10. ELISA: determinação do título dos soros. As placas foram sensibilizadas com as ESAs e incubadas com 10 soros negativos (amarelo), 10 soros soropositivos (verde) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho) em diluições seriadas. Os resultados representam as médias \pm 2DP das D.O.s a 492 nm de 10 soros por grupo.....67

Figura 11. ELISA: determinação do título do conjugado. As placas foram sensibilizadas com as ESAs e incubadas com 10 soros negativos (amarelo), 10 soros soropositivos (verde) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho) na diluição 1:200. A seguir, foram incubadas com o segundo anticorpo marcado com peroxidase em diluições seriadas. Os resultados representam as médias \pm 2DP das D.O.s a 492 nm de 10 soros por grupo.68

Figura 12. Gel SDS-PAGE 10%, corado por Coomassie Azul Brilhante, contendo antígeno bruto de taquizoítos (canaletas A e B) e ESAs

(canaletas C e D). Ambos foram dissolvidos em tampão de amostra na proporção de 4:1 (ESAs) e 50µl/1.10⁷ taquizoítos (antígeno bruto) e aplicados 20µl no gel de empilhamento. As amostras das canaletas B e D foram aquecidas por 3 minutos a 100°C.....70

Figura 13. Determinação da concentração protéica para transferência para membrana de nitrocelulose. Gel SDS-PAGE 10% corado por Coomassie Azul Brilhante contendo amostras de ESAs obtidas a partir de sobrenadantes de culturas celulares infectadas por *T. gondii* em diferentes diluições: 4,8, 9,6, 14,4, 19,2, 24 e 28,8 µg.....70

Figura 14. Western blotting: determinação do título dos soros. ESAs fracionadas em gel SDS-PAGE 10% foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com um soro com toxoplasmose cerebral nas diluições: 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 e com um soro negativo 1:50.....71

Figura 15. Western blotting: determinação do título do conjugado. ESAs fracionadas em gel SDS-PAGE 10% foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com um soro com toxoplasmose cerebral. Posteriormente foram incubadas com o segundo anticorpo nas diluições: 1:250, 1:500, 1:1000, 1:1500 e com um soro negativo.....71

Figura 16. RIFI: distribuição dos títulos dos soros. Grupo I, 106 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho), Grupo II, 99 soros soropositivos (verde) e Grupo III, 95 soros negativos (amarelo).....73

Figura 17. Western blotting: reatividade dos soros frente ao lisado bruto de taquizoítos (A, B e C) e as ESAs (D, E e F). Soro negativo (A e D), positivo para toxoplasmose (B e E) e com toxoplasmose cerebral (C e F).....73

Figura 18. ELISA - antígeno bruto: reatividade dos soros. As placas sensibilizadas com antígeno bruto de taquizoítos foram incubadas com os soros com toxoplasmose cerebral - Grupo I (vermelho), soros soropositivos – Grupo II (verde) e soros negativos – Grupo III (amarelo) na diluição 1:200.....75

Figura 19. ESA-ELISA: reatividade dos soros. As placas sensibilizadas com as ESAs foram incubadas com os soros com toxoplasmose cerebral - Grupo I (vermelho), soros soropositivos – Grupo II (verde) e soros negativos – Grupo III (amarelo) na diluição 1:200.....75

ÍNDICE

página

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Histórico.....	19
1.2. Morfologia e ciclo biológico.....	19
1.3. Toxoplasmose humana.....	23
1.3.1. Toxoplasmose em imunocompetentes.....	23
1.3.2. Toxoplasmose ocular.....	24
1.3.3. Toxoplasmose congênita.....	25
1.3.4. Toxoplasmose adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos.....	26
1.3.4.1. Toxoplasmose cerebral e aids.....	26
1.4. Epidemiologia da toxoplasmose.....	27
1.4.1. Epidemiologia da toxoplasmose cerebral e aids.....	29
1.5. Resposta imunológica na toxoplasmose	30
1.6. Diagnóstico da toxoplasmose.....	32
1.6.1. Diagnóstico da toxoplasmose cerebral.....	36
1.7. Invasão nas células hospedeiras.....	39
1.7.1. Organelas secretórias e antígenos de <i>T. gondii</i>	41
1.7.1.1. Micronemas.....	42
1.7.1.2. Roptrias.....	43
1.7.1.3. Grânulos Densos.....	44
1.7.2. Imunogenicidade.....	46
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo geral.....	48
2.2. Objetivos específicos.....	48

3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. Pacientes.....	49
3.1.1. Considerações éticas.....	50
3.1.2. Obtenção das amostras de sangue.....	50
3.2. Animais experimentais e <i>T. gondii</i>	50
3.2.1. Manutenção e obtenção dos parasitas.....	50
3.2.1.1. Taquizoítos peritonias.....	50
3.2.1.2. Taquizoítos provenientes de culturas celulares.....	51
3.3. Obtenção de antígenos de <i>T. gondii</i>	52
3.3.1. Taquizoítos formalizados para RIFI.....	52
3.3.2. Antígeno bruto de taquizoítos.....	52
3.3.2.1. Para o ensaio imunoenzimático (ELISA).....	52
3.3.2.2. Para o western blotting.....	53
3.3.3. ESAs.....	53
3.3.4. Dosagem protéica.....	54
3.3.5. Eletroforese vertical das proteínas.....	54
3.4. Diagnóstico.....	55
3.4.1. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	55
3.4.2. ELISA.....	56
3.4.3. Western blotting.....	57
3.5. Análise dos dados.....	58
4. RESULTADOS	60
4.1. Padronizações.....	60
4.1.1. Antígeno – ESAs.....	60
4.1.2. ELISA.....	64
4.1.3. Western blotting.....	69
4.2. Reatividade de anticorpos IgG na toxoplasmose crônica (soropositivos) e sintomáticos (toxoplasmose cerebral) frente aos antígenos formalizado, bruto de taquizoítos e ESAs.....	72

4.2.1. RIFI.....	72
4.2.2. Western blotting.....	72
4.2.3. ESA-ELISA.....	74
4.2.4. ESA: Reatividade das frações protéicas.....	76
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÕES.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8. ANEXOS.....	122

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

Anexo 2 - Parecer do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz.

Anexo 3- Prêmio de Honra ao Mérito na Área de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública do V Encontro do Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD, da Secretaria de Estado da Saúde – São Paulo/SP, em 2006.

Anexo 4 - Carta de Informações ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A toxoplasmose é uma zoonose causada por um protozoário parasita intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia (Levine et al., 1980). Foi descrito por Alfonso Splendore em Julho de 1908, parasitando um coelho de laboratório em São Paulo, Brasil. Na mesma época, no Instituto Pasteur da Tunísia, os pesquisadores Nicolle e Manceaux descreveram um microorganismo similar ao descrito por Splendore, em células mononucleares do baço e do fígado de um roedor norte-africano denominado *Ctenodactylus gondii*. Em 1909 Nicolle e Manceaux criaram o gênero *Toxoplasma* e a espécie *T. gondii*. Casos da doença humana passaram a ser descritos: Janku, em 1923, observou lesões oculares em um paciente, e Wolf e Cowen, em 1937, relataram casos de crianças em que, provavelmente, a transmissão congênita havia ocorrido. No Brasil, importantes contribuições ao conhecimento foram feitas, principalmente por Torres, em 1927, quando fez as primeiras descrições anatomo-patológicas da doença, e por Delascio, em 1956, com detalhadas informações sobre a forma congênita. Com o desenvolvimento do teste sorológico do corante por Sabin e Feldman, em 1948, foi possível associar as várias apresentações clínicas da doença à etiologia por *T. gondii* (Coutinho e Vergara, 2005).

1.2. Morfologia e ciclo biológico

T. gondii é um parasita que invade e se multiplica no interior de células nucleadas de mamíferos e de vários outros animais de sangue quente (Dubey e Beattie, 1988). Parasitam de preferência macrófagos teciduais, mas são encontrados também em secreções, células endoteliais, nervosas e musculares, apresentando assim, uma morfologia múltipla,

dependendo do habitat e do estado evolutivo. Há três estágios infectantes de *T. gondii*: os taquizoítos (livres), os bradizoítos (em cistos teciduais) e os esporozoítos (em oocistos) (Dubey, 1996). Essas três formas apresentam organelas citoplasmáticas características do filo Apicomplexa que constituem o complexo apical: conóide, anéis polares, microtúbulos subpelículaes, roptrias, micronemas e grânulos densos (Dubey et al., 1998).

Frenkel (1973) utilizou o termo “taquizoíto” para descrever o estágio de rápida multiplicação em quaisquer células do hospedeiro intermediário e nas células do epitélio intestinal do hospedeiro definitivo, presentes em grande número nas infecções agudas. Apresentam formato de meia lua e medem cerca de 6 µm de comprimento por 2 µm de largura (Figura 1A). Entram na célula hospedeira por penetração ativa e após a entrada, se tornam ovóides e envoltos por um vacúolo parasitóforo, o qual se acredita ser derivado de moléculas do parasita e da célula hospedeira (Hill et al., 2005). No interior do vacúolo parasitóforo, os taquizoítos se encontram protegidos dos mecanismos de defesa da célula (Smith, 1995). Multiplicam-se assexuadamente dentro da célula hospedeira por repetidas endodiogênias até a ruptura celular. Este processo continua até o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro frente ao parasita (Dubey et al., 1998; Montoya e Liesenfeld, 2004).

A infecção é estabelecida após algumas divisões. A seguir, os parasitas formam cistos teciduais, de aproximadamente 5 a 70 µm de diâmetro, podendo chegar a 300 µm com centenas de bradizoítos em seu interior (Figura 1B) (Buxton e Innes, 1995; Dubey, 1998). Estes se alojam no interior dos tecidos por longos períodos ou pela vida toda do hospedeiro, sem que cause resposta inflamatória ou dano tecidual significativo. Estão presentes nas infecções crônicas e congênitas (Duarte e Andrade Jr, 1994). São morfologicamente idênticos aos taquizoítos, exceto pela multiplicação mais lenta, pela localização do núcleo na parte posterior do parasita e por numerosos micronemas e grânulos de amilopectina. Medem cerca de 7 µm por 1,5 µm e são mais resistentes a enzimas proteolíticas do que os taquizoítos. Embora cistos teciduais contendo bradizoítos possam se

desenvolver no pulmão, fígado e rim, são mais prevalentes em tecidos neurais e musculares (cérebro, coração, músculo esquelético e retina) (Hill et al., 2005). A variação no tamanho depende do estágio do cisto, da célula hospedeira parasitada e do número de bradizoítos em seu interior (Weiss e Kim, 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Os oocistos são formas resultantes do ciclo sexuado e somente ocorrem no trato gastrointestinal dos felídeos com primo-infecção. Medem em torno de 10 μ m por 12 μ m e são eliminados pelas fezes dos gatos ainda não esporulados (Figura 1C). São as formas de resistência no meio ambiente e tornam-se infectantes após a esporulação que ocorre de três a cinco dias de acordo com as condições ambientais. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos que abrigam em seu interior quatro esporozoítos cada. Os esporozoítos medem, em média, cerca de 6 μ m por 2 μ m. Os oocistos esporulados podem permanecer viáveis no meio ambiente por um período de até 18 meses (Dubey et al., 1998; Montoya e Liesenfeld, 2004; Kravetz e Federman, 2005).

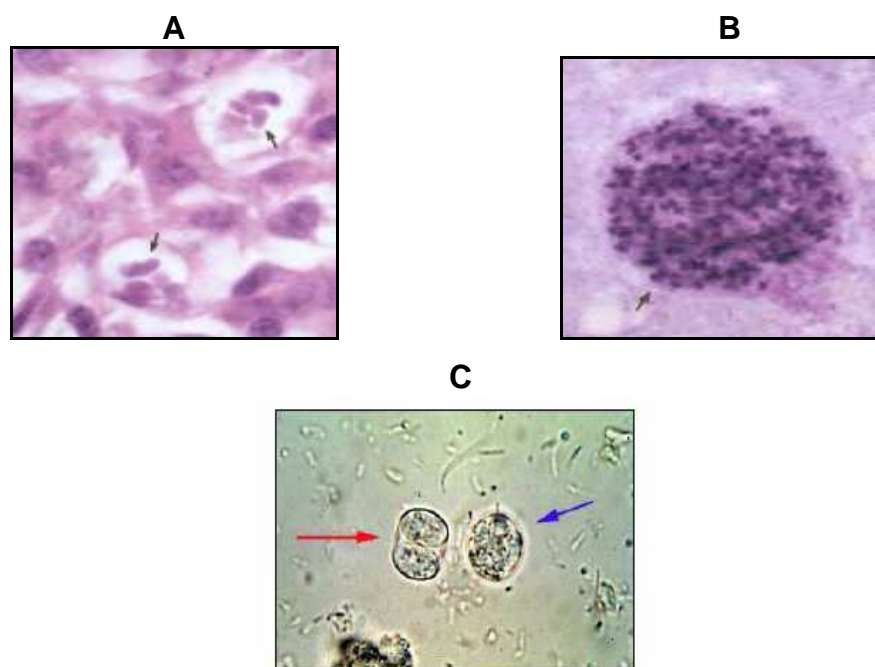


Figura 1. Corte de nódulo linfático de camundongo mostrando taquizoítos em multiplicação nas células de linfonodo (A), Esfregaço de tecido cerebral com bradizoítos encerrados dentro do cisto (B) (GIEMSA, 1000X), Oocisto esporulado (seta vermelha) e não esporulado (seta azul) (C) (40x).

Fontes A e B: <http://www.atlas.or.kr/atlas/include/viewimg.html>; C: <http://caltest.vet.upenn.edu/paraav/images>

T. gondii apresenta um complexo ciclo de vida, descrito somente em 1970, quando se descobriu que os hospedeiros definitivos são membros da família Felidae, incluindo o gato doméstico. Vários animais de sangue quente (mamíferos ou aves) servem como hospedeiros intermediários (Figura 2) (Dubey, 1996).

A fase sexuada ocorre no gato jovem e não imune que adquire a infecção pela ingestão de oocistos, cistos teciduais ou taquizoítos. O ciclo sexual ocorre nas células intestinais com formação e fertilização dos gametócitos e formação do zigoto. Este origina o oocisto imaturo que posteriormente é liberado após rompimento celular, sendo eliminado nas fezes após uma ou duas semanas de infecção. Os oocistos imaturos, não infectantes, sob condições ideais de temperatura, umidade e oxigênio, como as que ocorrem em regiões de clima tropical, esporulam e podem sobreviver de 12 a 18 meses no solo desde que mantidas tais condições (Rey, 2001; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Nos hospedeiros intermediários, a infecção pode se dar pela ingestão de oocistos maduros encontrados no solo, verduras, água contaminada e por carnes mal cozidas ou cruas contendo cistos com bradizoítos. Os parasitas penetram no intestino do hospedeiro e iniciam um processo de multiplicação assexuada dentro do vacúolo parasitóforo denominado endodiogenia, processo pelo qual cada núcleo divide-se formando duas células-filhas e o resto da célula mãe se degenera. Estes se multiplicam rapidamente até a ruptura da célula hospedeira liberando os taquizoítos para invadir outras células. Com o desenvolvimento da resposta imune humoral ocorre a lise de taquizoítos extracelulares, por meio de uma combinação de anticorpos e complemento (Beaman et al., 1995), porém alguns parasitas intracelulares podem persistir por algum tempo na medula espinhal ou no cérebro (Dubey, 1993).

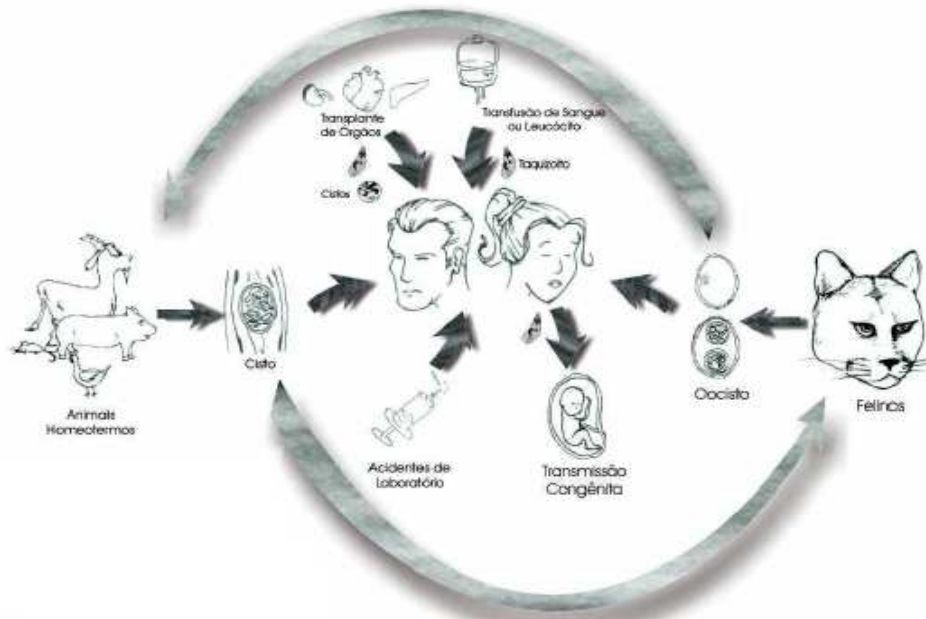


Figura 2. Vias de transmissão de *T. gondii* (Galisteo Jr, 2004).

1.3. Toxoplasmose humana

T. gondii, no hospedeiro humano, comporta-se como agente dotado de alta infectividade e de baixa patogenicidade. A fonte de infecção (cistos, oocistos ou taquizoítos), assim como o tamanho de inóculo, a linhagem da cepa e o estado imunológico do hospedeiro são fatores que influenciam na determinação do quadro mais ou menos severo da doença. Sendo assim, a toxoplasmose, enquanto doença pode ser dividida em quatro formas clínicas: a adquirida em pacientes imunocompetentes; a doença ocular, conseqüente da coriorretinite adquirida por via congênita ou excepcionalmente adquirida no período pós-natal; a forma congênita e a doença adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos (Amato Neto et al.,1995; Remington et al.,1995).

1.3.1. Toxoplasmose em imunocompetentes

Em imunocompetentes, formas assintomáticas da infecção constituem a maioria dos casos e figuram como acometimentos benignos, geralmente de cura espontânea. Contudo, cerca de 10-20% dos indivíduos infectados apresentam algum tipo de sintomatologia. A manifestação clínica

mais típica consiste em linfadenopatia isolada, com linfonodos rígidos, não supurados e discretos. Febre, por vezes, pode ocorrer. Este quadro clínico assemelha-se muito ao da mononucleose infecciosa. A doença é geralmente auto-limitada, observando-se em poucas semanas o desaparecimento dos sintomas. Outras formas podem surgir, embora com menor freqüência, como miocardites, pneumonites e encefalites. O aparecimento dos sintomas está relacionado com a virulência da cepa e com o sistema imune do hospedeiro (Remington e Klein, 1995; Bushrod, 2004; Montoya e Liesenfeld, 2004).

1.3.2. Toxoplasmose ocular

A infecção ocular acomete primariamente a retina e leva a um quadro de uveíte posterior (retinocoroidite) acompanhada freqüentemente de uveíte anterior. Em pacientes imunocompetentes é responsável por 30 a 50% dos casos (Garweg et al., 2000; Villard et al., 2003). A toxoplasmose ocular pode ser de origem congênita ou adquirida, como resultado da infecção aguda ou reativação, e em ambas o acometimento ocular pode ser precoce ou tardio (Montoya e Liesenfeld, 2004).

O grave impacto social da toxoplasmose ocular deve-se ao fato de levar à perda acentuada da visão. A lesão mais freqüente é a retinocoroidite focal, granulomatosa, necrosante, de coloração branco-amarelada e de bordas mal definidas. O tamanho é variável, desde um décimo do diâmetro papilar até dois quadrantes da retina (Bou et al., 1999). Freqüentemente encontra-se lesão satélite à outras cicatrizes antigas hiperpigmentadas e atróficas, sendo este achado patognomônico da toxoplasmose ocular. A lesão evolui para a cicatrização, passando por período de regressão, que varia de algumas semanas a muitos meses. Os sintomas primordiais incluem diminuição da visão pelo edema, inflamação ou necrose retiniana e opacidades (nuvens) no campo visual, hiperemia conjuntival e ciliar, dor e fotofobia. As recidivas freqüentes decorrem, provavelmente, da ruptura do cisto e liberação dos parasitas (Amato Neto et al., 1995; Remington et al., 1995).

Nos Estados Unidos e na Europa, a infecção por *T. gondii* é uma importante causa de retinocoroidite e, na maioria dos casos é resultante de infecção congênita. No Brasil, os estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Rio de Janeiro apresentam alta incidência de toxoplasmose ocular, sendo que a cidade de Erechin, no Rio Grande do Sul apresentou um índice de 17,7%, em uma população estudada de 1042 pessoas (Glasner et al., 1992; Garcia et al., 1999; Petersen et al., 2001).

1.3.3. Toxoplasmose congênita

A infecção congênita se caracteriza pela transmissão do parasita ao feto via placenta. Esta forma de infecção ocorre somente quando a mulher desenvolve infecção primária durante a gestação, que apesar da parasitemia temporária, raramente tem sintomas (Hill et al., 2005). Entretanto, quando este contato se efetua num período anterior ao acontecimento da concepção, anticorpos são formados e dificilmente o feto será infectado (Kravetz e Federman, 2005).

A infecção congênita adquirida durante o primeiro trimestre é mais severa do que aquela adquirida no segundo e terceiro trimestre (Desmonts e Couvreur, 1974; Remington et al., 1995). Um grande espectro de doenças clínicas pode ocorrer em crianças infectadas congenitamente, levando a um conjunto de manifestações, variando entre coriorretinite branda, que pode se apresentar muitos anos após o nascimento, a quadros mais severos com o aparecimento da tétrade de lesões: retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões e calcificação intracerebral. Destas, a doença ocular é a seqüela mais comum e a hidrocefalia a mais rara, porém, mais significativa (Desmonts e Couvreur, 1974; Remington et al., 1995; Kravetz e Federman, 2005).

As infecções fetais têm seqüelas imprevisíveis, mas a gravidade destas seqüelas pode ser prevenida ou reduzida com o tratamento da mãe durante a gravidez (Pinon et al., 2001; Montoya e Liesenfeld, 2004). Embora ainda haja controvérsia (Gilbert et al., 2001; Gilbert e Gras, 2003) sobre a real eficácia da espiamicina na diminuição do risco de transmissão materno-fetal da toxoplasmose, seu uso deve ser recomendado (Thulliez, 2001), não

eliminando, mas podendo diminuir em até 60%, a possibilidade de transmissão (Forestler, 1991).

A incidência da doença varia entre as regiões, mas é amplamente distribuída por todo o globo (Nóbrega e Karnikowski, 2005). Em países desenvolvidos, a doença afeta de 1 a 10 entre 10.000 recém-nascidos (Allain et al., 1998; Gilbert e Peckham, 2001). Na Europa, a prevalência entre mulheres gestantes varia de 7,7% a 45% (Logar et al., 1995; Allain et al., 1998; Jenum et al., 1998).

No Brasil, a ocorrência de toxoplasmose congênita varia de 0,2 a 2% (Silveira et al., 1988; Neto et al., 2000). Alguns estudos mostram que 50 a 80% das mulheres brasileiras em idade fértil exibem anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Por conseguinte, 20 a 50% delas são susceptíveis à infecção (Nóbrega e Karnikowski, 2005). No Estado de São Paulo (região metropolitana) estima-se que nascem cerca de 230 a 300 crianças infectadas por ano, ou seja, cerca de 1 a cada 1000 partos (Guimarães et al., 1993).

1.3.4. Toxoplasmose adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos

1.3.4.1. Toxoplasmose cerebral e aids

Outro grupo afetado pela toxoplasmose são indivíduos submetidos ao uso de drogas imunossupressoras como os transplantados, pacientes com doenças linfoproliferativas e pacientes com deficiência na imunidade celular como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Burg, 1988; Ferreira, 2000). Ao contrário do curso favorável da toxoplasmose na maioria dos indivíduos imunocompetentes, a doença pode ser particularmente grave e muitas vezes fatal nestes grupos de pacientes (Liesenfeld et al., 1999).

O sistema nervoso central (SNC) é o local mais afetado pela infecção, no qual a encefalite é a mais importante manifestação da doença,

causando severos danos ao paciente (Dubey e Beattie, 1988, Luft e Remington, 1992). A apresentação clínica da encefalite toxoplásmica classicamente apresenta-se como um processo sub-agudo, porém cerca de 10% dos casos pode se manifestar agudamente. Manifestações clínicas incluem mudanças no estado mental, apreensões, déficits motores focais, distúrbios de nervos cranianos, anomalias sensoriais, desordens de movimento e achados neuropsiquiátricos. Sinais nas meninges são raros. O achado focal mais típico é hemiparesia e anormalidades de fala (Franzen et al., 1997; Ferreira, 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004). Cerca de 95% da encefalite causada por *T. gondii* deve-se à reativação da infecção latente pela perda progressiva da imunidade celular (Luft e Remington, 1992).

Outro aspecto da encefalite por *T. gondii* é a presença de necroses cerebrais com predileção das lesões nos gânglios da base em ambos os hemisférios cerebrais (Luft e Remington, 1992). Os métodos de imagens podem revelar lesões focais no sistema nervoso, embora estas imagens possam compartilhar características semelhantes a abscessos, tumores, linfomas ou outras infecções oportunistas do sistema nervoso em pacientes HIV positivos (Franzen et al., 1997; Ferreira, 2000).

1.4. Epidemiologia da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose altamente disseminada, com taxas de prevalência variáveis nas diversas partes do globo (Dubey e Beattie, 1988). Estima-se que cerca de um terço da população mundial estejam infectadas, sendo que a maioria delas apresenta a forma assintomática (Tenter, 2000; Petersen e Dubey, 2001). A incidência da doença está sujeita às variações próprias de cada região, como o tipo de clima, hábitos culturais e alimentares de determinadas populações, sendo que a soropositividade aumenta com a idade, mas não varia entre os sexos (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Estudos sorológicos indicam que mais de 80% das infecções primárias por toxoplasmose são livres de sintomatologia em decorrência da

efetividade do sistema imunológico (Luft e Remington, 1992), embora graus variáveis da doença possam ocorrer em pessoas imunodeprimidas (Cantos, 2000). A doença sistêmica atinge indivíduos em todas as faixas etárias sendo que as lesões mais graves são encontradas em crianças expostas durante a vida intra-uterina, em indivíduos que apresentem algum tipo de comprometimento do sistema imunológico durante sua vida ou entrem em contato com cepas virulentas (Camargo, 2003). Nas últimas décadas, o parasita tem ganhado mais atenção, pois se apresenta como causa mais comum de lesões focais do SNC em pacientes com aids (Luft e Remington, 1992).

Nos Estados Unidos e no Reino Unido, estima-se que cerca de 16 a 40% da população esteja infectada. Na América Central e do Sul e na Europa Continental, a estimativa da infecção varia em torno de 50 a 80% (Dubey e Beattie, 1988; Hill et al., 2005). No Brasil, a prevalência sorológica de infecção por *T. gondii* é alta, variando em torno de 50 a 80% na população adulta (Bahia-Oliveira et al., 2003). Na grande São Paulo a prevalência gira em torno de 69% (Guimarães et al., 1993; Amendoeira et al., 1999). Kawarabayashi et al. (2007) verificaram uma positividade de 57,10% em um estudo que avaliou a prevalência de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em 1485 amostras de soros de mulheres atendidas na rede pública de saúde da grande São Paulo.

Os felídeos são considerados como os animais mais importantes na epidemiologia da toxoplasmose. Eles são os responsáveis pela contaminação do meio ambiente através da eliminação de oocistos, uma vez que, um único gato pode excretar milhões de oocistos após ingerir apenas um cisto tecidual. Oocistos esporulados podem permanecer viáveis no meio ambiente por longos períodos e são fonte de disseminação da infecção para herbívoros e outros animais que os ingerem e desenvolvem cistos em seus tecidos (Dubey, 1996; Hill et al., 2005). A alta prevalência de infecção por *T. gondii* na América Central e do Sul é provavelmente devida a altos níveis de contaminação do meio ambiente com oocistos (Dubey e Beattie, 1988; Glasner et al., 1992; Neto et al., 2000).

1.4.1. Epidemiologia da toxoplasmose cerebral e aids

Antes da pandemia da aids, a toxoplasmose cerebral constituía uma rara complicação que acometia pacientes imunossuprimidos, principalmente os transplantados renais (Harrison e McArthur, 1995). Após a introdução da aids, indivíduos soropositivos para toxoplasmose que contraíram o vírus HIV e apresentavam menos de 200 células T CD4+/ μ L de sangue freqüentemente apresentavam reativação da infecção latente. Mais de 80% destes pacientes desenvolveram toxoplasmose cerebral (Renold et al., 1992; Porter e Sande, 1992; Luft et al., 1993; Mariuz et al., 1997). Desde então, *T. gondii*, constitui a causa mais comum de lesões expansivas intracranianas em pacientes com aids (Simpson e Tagliati, 1994; Cohen, 1999; Luft e Chua, 2000; Mamidi et al., 2002).

Até 2005, existiam cerca de 40 milhões de pessoas infectadas pelo vírus HIV no mundo, sendo que cerca de 5 milhões foram infectadas neste mesmo ano com uma média de 3 milhões de mortes ao ano (UNAIDS 2006). No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de aids, em 1980, até Junho de 2006, já foram identificados por volta de 433 mil casos da doença. O país acumulou cerca de 183 mil óbitos até dezembro de 2005. As taxas de mortalidade foram crescentes até meados da década de 90 e estabilizaram-se em aproximadamente 11 mil óbitos anuais desde 1998. Após a introdução da terapia anti-retroviral altamente eficiente (HAART), observou-se uma importante queda na mortalidade. A partir do ano 2000, essa taxa se estabilizou em cerca de 6,4 óbitos por 100 mil habitantes, sendo esta estabilização mais evidente em São Paulo e no Distrito Federal (Ministério da Saúde, 2006).

A prevalência da toxoplasmose cerebral nestes pacientes está associada à prevalência da infecção por *T. gondii* na população geral. Estudos anteriores à era HAART relatam que a toxoplasmose cerebral estava presente em 25-50% dos pacientes (Beaman et al., 1992; Luft e Remington, 1992; Oksenhendler et al., 1994). Em Berlim e Paris, 25% dos pacientes com aids apresentariam toxoplasmose cerebral ao passo que nos

Estados Unidos esse valor seria de 10% e na Bélgica 12%. Nos países desenvolvidos, a toxoplasmose cerebral foi a segunda infecção oportunista mais comum relacionada à aids vindo atrás apenas da pneumocistose, causada por *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente denominado *P. carinii*) (Holliman, 1988; Luft e Remington, 1992).

Após a introdução da HAART observou-se uma diminuição da incidência e das mortes associadas a infecções oportunistas, incluindo a toxoplasmose (Ammassari et al., 1998; Sacktor, 2001; Abgrall et al., 2001; Jones et al., 2002). Porém, ocorreu discreta mudança na distribuição das doenças oportunistas definidoras de aids. Muitos pacientes apresentam como primeira doença a toxoplasmose cerebral e só após esta manifestação são diagnosticados como apresentando aids. Como desconhecem que estão infectados pelo vírus HIV, não se beneficiaram do uso dos anti-retrovirais (Ammassari et al., 2000; Leport et al., 2001; Manfredi e Chiodo, 2001; Gray e Keohane, 2003; Antinori et al., 2004).

Atualmente, a toxoplasmose figura na lista das principais doenças que causam considerável morbidade e mortalidade em pacientes com aids pela alta prevalência de lesões expansivas intracranianas que causa nestes pacientes (Ammassari et al., 2000; Sacktor, 2002; Antinori et al., 2004). No Brasil, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, a queda da incidência foi inferior à observada em países desenvolvidos. Atualmente, ela representa a primeira causa de doença no sistema nervoso central (Bahia-Oliveira et al., 2003; Marins et al., 2003; Vidal et al., 2003; Ministério da Saúde, 2006; Oliveira et al., 2006).

1.5. Resposta imunológica na toxoplasmose

A resposta imune de um hospedeiro à toxoplasmose é complexa e envolve tanto mecanismo celular quanto humoral, sendo o primeiro um fator preponderante de resistência contra a infecção (Darcy e Santoro, 1994; Kahi et al., 1998). A resposta imune é formada por uma cascata de eventos, envolvendo a imunidade inata que, embora inespecífica, possui

componentes importantes para a ativação, a diferenciação celular e a consolidação da defesa específica (Kahi et al., 1998).

A ativação do sistema imune ocorre por mecanismos múltiplos. Além do reconhecimento de antígenos de *T. gondii*, a lesão celular e citólise geram sinais não específicos que alertam as células fagocitárias da presença do agressor (Scott e Hunter, 2002). Os mecanismos de defesa ativados nesta fase precoce da infecção são inespecíficos, porém importantes para a organização da resposta específica. Nesta fase, células fagocitárias como as células dendríticas, monócitos e macrófagos desempenham um papel essencial no reconhecimento do agente invasor, na apresentação antigênica e geração de sinais específicos para as células efetoras (Paul, 1999).

Diferentes padrões de citocinas são secretados em resposta a diferentes formas de infecção, resultando em diferentes respostas efetoras. Na toxoplasmose, a citocina chave para a resistência é a interferon-gama (IFN- γ) envolvendo as atividades das células T helper e T citotóxicas, caracterizando resposta tipo Th1. Infecções experimentais em camundongos revelam que a produção de IFN- γ é um passo crítico para a proteção do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii* (Scharton-Kersten et al., 1996; Yap e Sher, 1999; Fujigaki et al., 2002). Linfócitos T e células Natural Killer (NK) produzem IFN- γ para que ocorra a ativação de macrófagos e das próprias células NK (Filisetti e Candolfi, 2004). Este mecanismo participa na indução da conversão de taquizoítos em bradizoítos (Jones et al., 1985; Bohne et al., 1993).

As células dendríticas controlam a magnitude e a qualidade da resposta Th1 com a produção de interleucina-12 (IL-12) (Scott e Hunter, 2002). Tanto parasitas íntegros quanto antígenos solúveis são capazes de induzir a produção de IL-12 e, desta forma estimular células efetoras como linfócitos T e células NK a produzir IFN- γ (Gazzinelli et al., 1994). Da mesma maneira que as células dendríticas e as células NK, os macrófagos também contribuem na modulação da imunidade pela secreção de IL-12 e se destacam por exercer funções efetoras antimicrobianas. A produção de

reagentes oxidativos, óxido nítrico e atividade de enzimas lisossomais constituem alguns dos vários mecanismos microbicidas dos macrófagos (Stafford et al., 2002).

A secreção de IL-6 representa importante fator de resistência contra a infecção precoce (Jebbari et al., 1998). Células Th2 participam da regulação da resposta imune pela secreção de IL-4 (Roberts et al., 1996) e IL-10 que modulam a síntese tanto de IL-12 quanto de IFN- γ . Assim respostas imunes excessivas que predispõem a sérias inflamações e a lesões teciduais podem ser evitadas (Neyer et al., 1997). Por outro lado, o fator beta transformador de crescimento (TGF- β) e IL-10 podem diminuir a atividade de macrófagos e células NK levando a exacerbação da infecção (Hunter et al., 1995).

O papel da resposta humoral já foi extensivamente estudado. Sabe-se que ela é mediada por linfócitos T, na medida em que a produção de células de memória e a ativação e diferenciação de linfócitos B dependem da interação conjunta destas células B com antígenos apresentados na superfície de células apresentadoras e citocinas produzidas por linfócitos T CD4⁺. Mesmo com a produção de imunoglobulinas pertencentes aos isotipos G, M, A e E, a resposta humoral por si só não exerce um papel protetor no curso da toxoplasmose, atuando na opsonização de parasitas (Sharma, 1990; Huskinson et al., 1990). Na presença de complemento, anticorpos específicos podem lisar taquizoítos extracelulares (Schreiber e Feldman, 1980).

1.6. Diagnóstico da toxoplasmose

O isolamento do parasita de sangue ou outros fluídos corporais demonstra uma possível infecção aguda (Montoya e Liesenfeld, 2004). Métodos tradicionais de detecção direta do parasita são dificilmente realizáveis, pois demandam certo tempo e apresentam baixa sensibilidade (Wong e Remington, 1993; Rey, 2001). De igual forma, sabe-se que a parasitemia é detectável de forma intermitente em alguns pacientes (Hofflin

e Remington, 1985; Filice, 1993; Kompalic-Cristo, 2004). Por ser um parasita intracelular obrigatório, a cultura *in vitro* é complicada de ser mantida, tem custo elevado e necessita de longo tempo para fornecer resultado, muitas vezes só sendo efetiva em menos de 50% dos casos. O isolamento do parasita pode ser feito com a inoculação em camundongos, o que é mais sensível, porém requer de três a seis semanas e manutenção de animais em biotérios (Grover et al., 1990; Hitt e Filice, 1992; James et al., 1996; Lin et al., 2000; Kupferschmidt et al., 2001). A detecção de taquizoítos também pode ser feita em cortes histológicos do cérebro, ou por esfregaços de líquidos corpóreos, mas a biópsia cerebral é um procedimento muito agressivo para uso em rotina (Dupouy-Camet et al., 1993; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Diante da dificuldade e da baixa sensibilidade dos exames utilizados para evidenciar os parasitas, os exames sorológicos são mais comumente utilizados no diagnóstico da toxoplasmose. Estes, se baseiam principalmente, na detecção de anticorpos específicos das classes IgM, IgA, IgE e IgG. A presença desses anticorpos durante a infecção permite a análise de perfis sorológicos característicos quer seja na infecção recente (fase aguda) ou infecção tardia ou latente (crônica) (Contreras et al., 2000).

O primeiro teste disponível para detectar anticorpos específicos anti-*T. gondii* foi a reação de Sabin-Feldman ou o clássico teste do corante, mundialmente conhecido pelo nome de “dye test” (Sabin e Feldman, 1948). Cinquenta anos depois da sua descrição, ainda é considerado um teste de referência com altas taxas de sensibilidade e especificidade. Entretanto, a sua utilização é restrita a poucos laboratórios devido à complexidade da técnica, necessidade de parasitas viáveis e a constante manipulação de camundongos infectados. Tais fatores constituem risco para os laboratoristas (Reiter-Owona et al., 1999).

Atualmente, as técnicas mais utilizadas no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos os testes apresentam boa especificidade e sensibilidade nas fases aguda (pesquisa de anticorpos IgM) e crônica (pesquisa de anticorpos IgG) (Montoya e Liesenfeld, 2004).

A RIFI é rotineiramente utilizada e considerada “padrão ouro”. No entanto, na detecção de anticorpos IgM, tem o inconveniente de possíveis resultados falsos-positivos, pela presença no soro de anticorpos IgM anti-IgG (fator reumatóide) ou falso-negativos, pela competição de anticorpos IgG com os IgM, pelos mesmos sítios antigênicos (Camargo et al.,1972; Sanchez, 2001). O maior valor do teste para anticorpos específicos IgM reside no fato de que um teste negativo exclui o diagnóstico de toxoplasmose aguda com menos de três semanas de duração, mas não exclui a possibilidade de infecções mais antigas (Rey, 2001; Coutinho e Vergara, 2005).

Outro teste utilizado na rotina laboratorial é a ELISA, que além de elevada sensibilidade e especificidade, tem como vantagem a rapidez, simplicidade técnica, versatilidade e objetividade de leitura. Detecta quantidades extremamente pequenas de anticorpos, podendo ter elevada precisão, se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados (Sanchez, 2001; Camargo, 2001).

O diagnóstico da toxoplasmose aguda é baseado na demonstração de um aumento significativo no nível de anticorpos IgG e /ou a presença de anticorpos IgM. Entretanto a elevada prevalência de anticorpos IgG entre indivíduos normais na maioria da população e a persistência de anticorpos IgM por longos períodos em algumas pessoas tem complicado a interpretação dos testes sorológicos quando há suspeita de toxoplasmose aguda (Brooks et al.,1987; Remington & Klein,1995).

As técnicas de detecção de anticorpos IgA e avides de anticorpos IgG foram introduzidas para avaliar a fase da infecção, principalmente em gestantes (Bessières et al., 1992). Anticorpos IgA apresentam cinética parecida aos dos anticorpos IgM, porém com sensibilidade maior (Stepick–Biek et al., 1990; Lappalainen e Hedman, 2004). Constitui um importante marcador sorológico de infecção em gestantes, fetos e recém-nascidos, pois desapareceriam de circulação mais rapidamente que os anticorpos da classe IgM (Pinon et al., 2001). A desvantagem é que aproximadamente 5% dos adultos não produzem IgA ou, alguns indivíduos podem permanecer com a

IgA específica por anos. Por esta razão é pouco utilizado para compor o diagnóstico de infecção recente (Ashburn et al., 1998; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Testes para detecção de anticorpos IgE devem ser somente usados em combinação com outros métodos sorológicos (Pinon et al., 1990; Wong et al., 1993). Sua demonstração não parece ser particularmente útil para diagnóstico de infecção por *T. gondii* no feto ou recém-nascido quando comparados com testes para anticorpos IgA (Wong et al., 1993; Montoya e Remington, 1995).

Hedman et al. (1989) introduziram o teste ELISA-avidez de IgG com objetivo de diagnosticar uma infecção recentemente adquirida. Baseia-se na força total que ocorre entre a interação antígeno-anticorpo (Hedman et al., 1989; Joynson et al., 1990; Cozon et al., 1998). Durante a resposta imune, o processo de maturação de anticorpos IgG é acompanhado pelo aumento de sua afinidade. Para a avaliação da avidez, a técnica se baseia na maior ou menor facilidade com que os anticorpos são dissociados de complexos antigênicos específicos. Essa dissociação resulta da ação de agentes desnaturantes de proteínas ou desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogênio, utilizadas para diluir o soro teste ou adicionadas após a formação do complexo antígeno-anticorpo. O tratamento com uréia é considerado o mais simples e eficiente na medida da avidez dos anticorpos IgG (Holliman et al., 1994). É um método altamente sensível e específico na identificação de infecção primária aguda por *T. gondii* durante a gravidez (Jenum et al., 1997). Anticorpos de baixa avidez (30% ou menos) são produzidos em estágio precoce da infecção enquanto que anticorpos de alta avidez (60% ou mais) refletem infecção crônica. Valores entre 30% e 60% não permitem a caracterização da fase da doença, no entanto, a alta avidez de IgG exclui infecções primárias com menos de 4 meses de duração (Joynson et al., 1990; Gutiérrez e Maroto, 1996).

1.6.1. Diagnóstico da toxoplasmose cerebral

O diagnóstico “definitivo” da toxoplasmose cerebral requer a demonstração direta do parasita no tecido cerebral. O diagnóstico provável ou sugestivo (CDC, 1993; Potergies et al., 2004) baseia-se em: i) sinais neurológicos focais, alterações do nível ou do conteúdo da consciência, evidência de imagem tomográfica de lesão expansiva, com ou sem realce da substância de contraste; ii) presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro e iii) resposta ao tratamento específico anti-*T. gondii*. Os estudos de imagens por tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM) mostram que lesões simples ou múltiplas estão presentes em mais de 90% dos pacientes com toxoplasmose cerebral. Porém, a RNM freqüentemente revela lesões que em alguns casos, não são detectadas pela TC (Porter e Sande, 1992; Luft e Remington, 1992). O diagnóstico da toxoplasmose cerebral quando baseado em imagens, pode ser confundido com outros processos patológicos como o vírus *Epstein-Barr* associado ao linfoma primário do SNC. Diante disso, deve ser acompanhada a evolução favorável tanto do ponto de vista clínico como radiológico após a administração da terapia específica (Alonso et al., 2002). Contudo, as características clínicas e radiológicas podem ser idênticas em ambas as infecções (Roberts e Storch, 1997). A resposta à terapêutica empiricamente instituída ocorre, em geral, entre o 7º e 14º dia (Wanke et al., 1987; Cimino et al., 1991; Luft et al., 1993). No entanto, em áreas com alta prevalência da toxoplasmose, tais pacientes podem ser expostos desnecessariamente aos efeitos adversos do tratamento específico, em até 40% dos casos (Haverkos, 1987; Lepout et al., 1988; Raffi et al., 1997).

A introdução das técnicas de imagens (tomografia computadorizada por emissão de fótons e por emissão de positrons) e as moleculares (reação em cadeia da polimerase - PCR) tornaram a avaliação inicial das lesões focais nos pacientes com aids menos invasiva, pois diminuíram o número de biópsias (Antinori et al., 1997; Cingolani et al., 1998; Antinori et al., 2000; Ammassari et al., 2000; Skiest, 2002; Vidal et al., 2004).

Contudo, nas últimas décadas têm se notado uma extrema variação na sensibilidade da PCR no líquido cefalorraquidiano (LCR). A maioria relata uma sensibilidade de 50% (11.5-100%), porém com especificidade alta (96-100%) (Schoondermark-van de Ven et al., 1993; Novati et al., 1994; Dupon et al., 1995; Cingolani et al., 1996; Cinque et al., 1996; Gianotti et al., 1997; Priya et al., 2002; Vidal et al., 2004). No entanto, a PCR em amostras de LCR apresenta importante limitação. Sua coleta é muito invasiva, principalmente em crianças e contra-indicado em pacientes com lesões cerebrais expansivas com risco de herniação cerebral (Eggers et al., 1995; Antinori et al., 1997; Cingolani et al., 1998; Cohen, 1999). Um estudo que incluiu 122 pacientes com lesões cerebrais expansivas relatou que 22% tiveram contra-indicações para punção liquórica (Cingolani et al., 1998). Já outro estudo relatou que 12 (48%) de 25 pacientes com toxoplasmose cerebral tiveram contra-indicações para punção lombar (Dupon et al., 1995).

Entretanto, a pesquisa de DNA de *T. gondii* também tem sido avaliada em amostras de sangue de pacientes com toxoplasmose cerebral e aids, com sensibilidades variáveis entre 25-77% (Dupouy-Camet et al., 1993; Dupon et al., 1995; Franzen et al., 1997; Joseph et al., 2002). Colombo et al. (2005) através da PCR, estudou 64 pacientes com toxoplasmose cerebral e 128 pacientes com outras doenças oportunistas e obtiveram uma sensibilidade de 80% e especificidade de 98%, destacando que a PCR utilizada em amostras de sangue pode apresentar elevada sensibilidade e especificidade, desde que sejam estabelecidos critérios rígidos, como a forma e o tempo de coleta, o processamento das amostras e a reação in situ. Contudo, a terapia específica anti-*T. gondii* interfere na sensibilidade do método. Amostras de LCR ou sangue devem ser colhidas somente até o terceiro dia pós-tratamento (Dupouy-Camet et al., 1993; Novati et al., 1994; Cingolani et al., 1996; Vidal et al., 2004).

Em relação ao valor dos testes sorológicos, a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* é discutível, uma vez que a doença resulta, comumente, de reativação da infecção latente, durante fase avançada de imunossupressão, sendo o perfil sorológico destes pacientes, em geral com

ausência de anticorpos IgM, semelhante ao da população com infecção crônica (Danneman et al., 1992; Raffi et al., 1997).

A pesquisa de imunoglobulinas IgA no soro, um marcador de infecção aguda, apresenta resultados conflitantes em pacientes com toxoplasmose cerebral e aids e sua demonstração na saliva não se mostrou útil para diferenciação entre infecção recente e crônica (Darcy et al., 1991; Hajeer et al., 1994). Borges e Figueiredo (2004b) estudando um grupo de 55 pacientes com toxoplasmose cerebral e aids verificaram que não houve correlação entre a positividade de anticorpos IgA no soro e o diagnóstico de toxoplasmose cerebral, comportando-se como os anticorpos IgM, não sendo útil portanto, para o diagnóstico diferencial da encefalite toxoplásmica.

Têm-se demonstrado que aproximadamente 50% dos pacientes com encefalite por *T. gondii* irão apresentar anticorpos específicos no líquido (Wainstein et al., 1993). Este achado, porém, deve ser interpretado com cautela, pois a sua presença pode significar apenas transferência passiva de anticorpos séricos para o SNC (Luft et al., 1984; Patel et al., 1993; Borges e Figueiredo, 2004b). Outro fator que deve ser considerado é que a encefalite por *T. gondii* é primariamente uma infecção parênquimal, onde a capacidade de se detectar um aumento da produção intratecal de anticorpos dependerá da proximidade da lesão das meninges (Potasman et al., 1988; Borges e Figueiredo, 2004a).

Títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* não são utilizados para identificar pacientes com reativação ou com risco de desenvolver toxoplasmose cerebral. Alguns artigos relatam que não observaram nenhuma correlação com o aparecimento da doença e a variação de títulos IgG (Navia et al., 1986; Bishburg, et al., 1989; Grant et al., 1990; Luft et al., 1993; Aarons et al., 1996; Raffi et al., 1999; Leport et al., 2001). Contraditoriamente, alguns artigos sugerem que altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* em pacientes com aids podem ser preditores de toxoplasmose cerebral e salientaram a importância do estudo dos padrões específicos de anticorpos IgG (Derouin et al., 1996; Vidal e Penalva de Oliveira, 2002).

Derouin et al. (1991), Hellerbrand et al. (1996) e Colombo (2005) demonstraram que os títulos altos de IgG apresentam elevado valor diagnóstico para toxoplasmose cerebral. LaRocco et al. (1993) e Derouin et al. (1996) relataram que pacientes com títulos sorológicos altos de IgG apresentam mais risco de desenvolver toxoplasmose cerebral que aqueles com títulos menores. Apesar dos estudos com resultados contraditórios, a utilização do diagnóstico sorológico parece ser um recurso a ser considerado na abordagem inicial dos pacientes com suspeita ou risco de toxoplasmose cerebral.

1.7. Invasão nas células hospedeiras

Um evento chave na biologia dos parasitas do filo Apicomplexa, que incluem os gêneros *Plasmodium*, *Criptosporidium* e *Toxoplasma* é a invasão na célula hospedeira. Durante este processo ocorre a participação de duas principais classes de proteínas: as de superfície que agem como ligantes no reconhecimento inicial da célula alvo e as excretadas/secretadas que estão estocadas em organelas secretórias e que medeia a invasão ativa dos taquizoítos (Speer et al., 1995; 1997; Spano et al., 2002; Borges, 2005).

O complexo apical é constituído pelas organelas secretórias denominadas micronemas, roptrias e grânulos densos; e pelos elementos do citoesqueleto (Figura 3). Dentre esses elementos destaca-se o conóide, que se localiza no extremo apical do parasita e associa-se aos microtúbulos e ao citoesqueleto de actinmiosina promovendo a força necessária para a movimentação do parasita. A invasão por *T. gondii* é rápida (<30 s) e dinâmica, constituindo um processo complexo que ocorre em etapas (Leriche e Dubremetz, 1991; Dubremetz et al., 1993; Carruthers e Sibley, 1997; Wan et al., 1997). O taquizoíto, por meio do conóide estabelece contato de seu extremo apical com a membrana da célula hospedeira e realiza o movimento de *gliding*, que é o movimento de rotação do parasita ao longo de seu eixo, oscilação e ondulação (Speer et al., 1997). Esse processo, que envolve o sistema actinmiosina permite a liberação apical e

subseqüente redistribuição de adesinas provenientes dos micronemas em direção ao pólo posterior do parasita. A interação com ligantes na superfície da célula hospedeira leva à formação de uma junção móvel permitindo o processo de invasão da célula (Meissner et al., 2002). Os componentes das roptrias são secretados simultaneamente para formação do vacúolo parasitóforo contribuindo tanto em sua formação como nas propriedades funcionais de sua membrana (Wan et al., 1997).

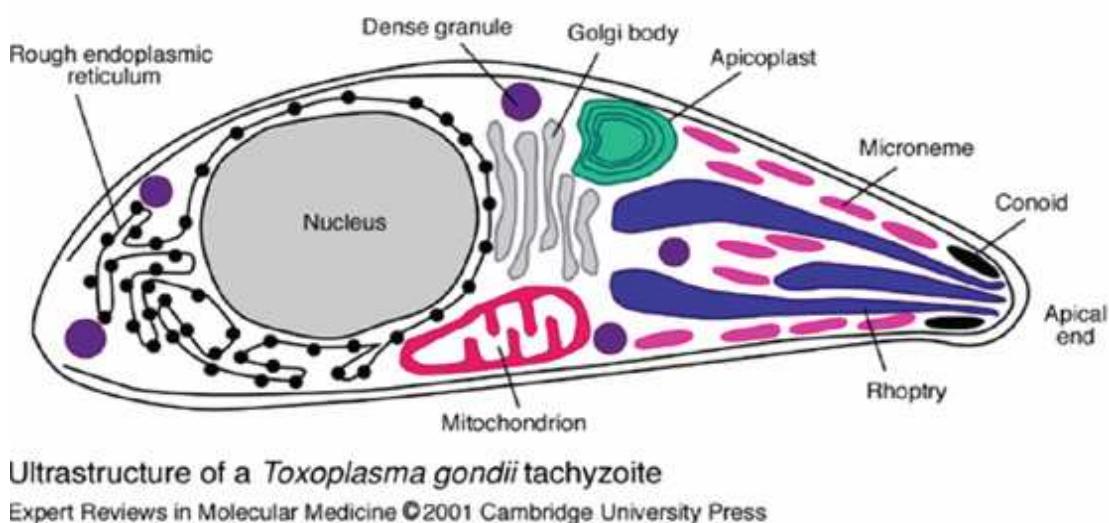


Figura 3. Taquizoíta de *T. gondii*. Ilustração das estruturas e organelas.

Fonte: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_01/S1462399401002204sup013.gif

O sucesso de *T. gondii* como patógeno depende de sua capacidade de invadir, residir e multiplicar-se dentro da célula hospedeira. No interior das células, a formação dos vacúolos o protege contra radicais livres, variações de pH, flutuações osmóticas e contato com anticorpos, evitando assim, os mecanismos de defesa do hospedeiro (Wan et al., 1997; Hill et al., 2005).

1.7.1. Organelas secretórias e antígenos de *T. gondii*

Os componentes imunogênicos de *T. gondii* estão predominantemente distribuídos na membrana plasmática compreendendo os antígenos de superfície (SAG) e compartimentalizados nas organelas secretórias liberados no momento da invasão celular.

A superfície celular externa dos taquizoítos é recoberta com proteínas de peso molecular variando de 22 a 43 kDa. Todas ancoradas na membrana por pontes de glicosilfosfatidilinositol (GPIs) (Tomavo et al., 1993). Essas proteínas são estruturalmente relacionadas ao antígeno de superfície altamente imunogênico SAG1, que representa até 5 % do total de proteínas de taquizoítos, porém não expresso em bradizoítos ou esporozoítos (Bulow et al., 1991).

Coletivamente estes antígenos são conhecidos como superfamília de proteínas SRS (seqüências relacionadas à SAG1) (Jung et al., 2004). Este grupo de antígenos promove a interação entre a membrana do parasita e a célula hospedeira através de moléculas ligantes ou receptores celulares que auxiliam o parasita na entrada da célula (Kasper e Mineo, 1994; Grimwood e Smith, 1995).

A expressão dessas proteínas é regulada de acordo com a fase do desenvolvimento biológico do parasita. As proteínas SAG1 e SAG3 (P43) são exclusivamente produzidas por taquizoítos (Gross et al., 1996), bem como a SAG2A (Lekutis et al., 2000; Cleary et al., 2002). Já a SAG2C/D, BSR4 e SRS9 são encontradas apenas em bradizoítos (Lekutis et al., 2000; Cleary et al., 2002). As proteínas SAG4 e BSR4/p36 são proteínas de superfície ligadas à proteína do citosol BAG1, expressa especificamente em bradizoítos (Bohne et al., 1995; Odberg-Ferragut, 1996).

De maneira geral, *T. gondii* excreta/secretora uma grande variedade de proteínas. Várias já foram descritas e exercem importantes funções na invasão (Norrby e Lycke, 1967; Norrby et al., 1968), replicação e manutenção dos parasitas na célula hospedeira (Cesbron-Delauw e Capron, 1993; Carruthers, 1999). A estas proteínas ou antígenos denominam-se de

excreção/secreção ou ESAs, detalhados a seguir de acordo com sua organela secretória. Sua expressão e conseqüente estimulação do sistema imune hospedeiro constituem em um importante objeto de estudo na toxoplasmose (Capron e Dessaint, 1988; Cesbron-Delauw e Capron, 1993; Prigionne et al., 2000).

1.7.1.1. Micronemas

Os micronemas são estruturas cilíndricas localizadas no terço anterior do corpo do parasita (Carruthers, 1999). Promovem motilidade, ligação e interação parasita-hospedeiro pela produção de antígenos de excreção/secreção. A produção destes antígenos é regulada por estas interações parasita-hospedeiro e por níveis de cálcio intracelular do parasita (Wan et al., 1997; Carruthers e Sibley, 1999; Brecht et al., 2001; Reiss et al., 2001).

As proteínas dos micronemas (MIC) pertencem à família TRAP (proteína anônima relacionada à trombospondina) que se caracteriza por exibir um domínio transmembrana que age como uma âncora molecular para o movimento de *gliding* do parasita. Esse domínio corresponde ao tipo EGF (fator de crescimento epidermal) e confere a essas proteínas funções adesivas e de interações receptor-ligante (Kappe et al., 1999). São conhecidas pela sigla TgMIC e possuem a capacidade de se agregarem a complexos proteicos para atuação mútua. De acordo com as características estruturais, as proteínas solúveis compreendem as TgMIC1, 3, 4 e 11; e as transmembranas TgMIC2, 6, 7, 8, 9 e TgAMA1.

As TgMIC2 (Donahue et al., 2000), TgAMA1 (Hehl et al., 2000), TgMIC6, 7, 8 e 9 (Meissner et al., 2002) formam complexos moleculares com uma ou mais adesinas solúveis do micronema, de modo que as primeiras servem como carreadoras das segundas, facilitando o tráfico de proteínas recém-sintetizadas para essas organelas. Assim, estudos mostraram que TgMIC8 auxilia na triagem da adesina solúvel, TgMIC3 para os micronemas (Meissner et al., 2002). Do mesmo modo foi evidenciada a associação de

TgMIC2 com TgM2AP durante o transporte para essas organelas (Rabenau et al., 2001; Huynh et al., 2003). As adesinas solúveis apresentam um papel importante durante os estágios de invasão da célula hospedeira. Pela ancoragem da TgMIC1 e TgMIC4 na superfície do parasita, TgMIC6 pode estabelecer uma ponte entre o parasita e a célula hospedeira e em seguida se redistribuir em direção ao pólo posterior do mesmo, contribuindo assim, na motilidade e processo de invasão (Sibley et al., 1998; Reiss et al., 2001). Esses dados sugerem que a TgMIC6 funciona como molécula de ancoragem nesse tráfico para os micronemas (Reiss et al., 2001; Joiner e Roos, 2002).

Outras proteínas micronemiais (MIC5, MIC10, M2AP e SUB1) não contêm seqüências adesivas, mas somente funções acessórias ou alternativas (Brydges et al., 2000; Donahue et al., 2000; Hoff et al., 2001; Miller et al., 2001; Rabenau et al., 2001).

1.7.1.2. Roptrias

As roptrias são organelas secretórias eletrodensas, delimitadas por membranas, que assumem a forma de largas claves (Perkins, 1992). Suas proteínas participam do processo de ataque e invasão das células hospedeiras por taquizoítos, assim como do processo de biogênese de um vacúolo parasitóforo funcional ao parasita (Carruthers, 1999; Brecht et al., 2001).

A secreção destas proteínas ocorre no momento da união apical, antes da penetração na célula hospedeira (Carruthers e Sibley, 1997). Estudos cinéticos mostram que a liberação destas proteínas se completa por volta de um minuto e, em seguida são internalizadas para exercerem seu papel em relação ao vacúolo parasitóforo (Sam-Yellowe et al., 1988; Saffer et al., 1992; Carruthers e Sibley, 1997). Ensaios de imunocitoquímica revelam que os conteúdos das roptrias não são homogêneos. Algumas proteínas se localizariam na região basal da organela ao passo que outras na sua porção apical (Blackman e Bannister, 2001).

As proteínas das roptrias são representadas pela abreviação ROP. A ROP1 (60 kDa) exibe uma extrema assimetria de cargas com um domínio N-terminal ácido e um domínio C-terminal básico e participa de interações proteína-proteína (Ossorio et al., 1992). Schwartzman (1986) identificou a ROP1 como um “fator de aumento de penetração” previamente caracterizado em *T. gondii* (Lycke et al., 1968) e por algum tempo ela foi considerada como a molécula chave para a penetração do parasita na célula hospedeira. Entretanto, foi mostrado que a ruptura do gene *ROP1* não provocou efeito na capacidade de invasão em mutantes (Kim et al., 1993; Soldati et al., 1995), assim como, a deleção do gene da roptria *RAP1* em *Plasmodium falciparum* também não afetou a invasão do parasita ou seu crescimento (Baldi et al., 2000).

ROP2, ROP3, ROP4 e ROP8 são antigenicamente reativas entre si e podem se sobrepor em funções (Carruthers, 1999). As sequências de DNA de ROP2 e ROP8 são altamente homólogas (Carruthers, 1999; Beckers et al., 1997). A ROP2 (54 kDa) é secretada durante o processo de penetração de *T. gondii* na célula hospedeira e se encontra em associação com a parede da membrana do vacúolo parasitóforo. Seu domínio N-terminal é exposto na face citoplasmática do vacúolo parasitóforo e pode estar envolvida na associação do vacúolo com organelas citoplasmáticas da célula hospedeira tais como retículo endoplasmático e mitocôndria (Sinai et al., 1997; Sinai e Joiner, 2001).

Outras proteínas das roptrias foram identificadas usando anticorpos monoclonais (Leriche e Dubremetz, 1991). Uma nova proteína da roptria, designada como BRP1 foi recentemente identificada na nascente de organelas achadas durante a primeira divisão de bradizoítos, mas não em taquizoítos (Schwarz et al., 2005).

1.7.1.3. Grânulos densos

Os grânulos densos são organelas esféricas distribuídas pelo citoplasma do parasita com uma média de diâmetro de $0.2\mu\text{m}$ (Carruthers,

1999; Prigione et al., 2000). Sua matriz é uniformemente eletrodensa devido a alta concentração de proteínas (Souza, 2006). Carruthers e Sibley (1997) mostraram que a secreção de proteínas dos grânulos densos ocorre após a invasão do parasita e sua internalização dentro do vacúolo parasitóforo, principalmente nos primeiros 10-20 minutos da formação do vacúolo. Diferentemente da secreção dos micronemas e roptrias que ocorre na região apical, a secreção de grânulos densos ocorre nas regiões laterais do protozoário (Souza, 2006). Pouco é o conhecimento sobre a função precisa das proteínas dos grânulos densos (Adjogble et al., 2004), sabe-se que as proteínas secretadas associam-se com a membrana do vacúolo parasitóforo e com a rede membranosa vacuolar derivada do parasita (Souza, 2006). Estas proteínas promovem a replicação intracelular, possivelmente por meio do transporte e processamento de nutrientes que são retirados da célula hospedeira (Carruthers, 1999).

Nove proteínas específicas dos grânulos densos, GRA1-9 (Cesbron-Delauw, 1994; Fischer et al., 1998; Jacobs et al., 1998; Carey et al., 2000; Adjogble et al., 2004) e algumas enzimas, incluindo duas nucleosídeos trifosfato hidrolases (NTPases) (Asai et al., 1983) e dois inibidores de proteases (Morris et al., 2002; Pzenny et al., 2002) foram caracterizados em *T. gondii*.

As proteínas GRA1 possuem um tamanho aproximado de 23 kDa, são relativamente abundantes e solúveis no interior do vacúolo parasitóforo ou se difundem com a rede membranosa intravacuolar do parasita (Sibley et al., 1995). Dentro do vacúolo parasitóforo ligam-se a íons Ca^{2+} e estão envolvidas na homeostase deste íon (Cesbron-Delauw et al., 1989). As GRA2 (28.5 kDa) estão associadas com a rede membranosa intravacuolar (Mercier et al., 1993, 1998a). Alguns estudos baseados na observação de deficiência de GRA2 em mutantes de *T. gondii* apresentaram uma atenuada virulência para camundongos sugerindo que esta proteína desempenha algum papel na virulência do parasita (Mercier et al., 1998b; Carruthers, 1999). As GRA3 (30 kDa) formam complexos multiméricos associados à membrana do vacúolo parasitário por interações hidrofóbicas (Ossorio et al.,

1994). As GRA4, 5, 6, 7 e 8 apresentam um segmento transmembrana e constituem uma espécie de “peneira molecular” que permite a passagem de moléculas menores que 1900 Da pela interface vacuolar (Schwab et al., 1994). Recentemente, uma nova proteína dos grânulos densos foi isolada, a proteína B10 (318 aminoácidos, 41 kDa) referida como GRA9. Semelhante a outras proteínas GRA, a GRA9 é secretada dentro do vacúolo parasitóforo sendo encontrada nas formas solúvel e insolúvel. Está associada com a rede membranosa intravacuolar dentro do vacúolo parasitóforo (Adjogble et al., 2004).

1.7.2. Imunogenicidade

Nas últimas décadas diversos estudos mostraram que as ESAs de *T. gondii* conferem alta imunogenicidade nos hospedeiros (Potasman et al., 1986; Decoster et al., 1988; Bessières et al., 1992) e podem ser detectadas logo no início da infecção (Hughes e VanKnapen, 1982).

O marcador molecular de 97 kDa (p97), caracterizado como uma proteína citosólica presente na solução de ESAs, é reconhecido por anticorpos IgG e IgM no início da infecção aguda e durante os estágios crônicos da toxoplasmose (Ribeiro et al., 2002). O antígeno de 41 kDa, também pertencente às ESAs e designado de B10 apresenta um bom potencial diagnóstico em western blotting e ELISA, pois apresenta imunoreatividade na toxoplasmose humana, porém não difere a infecção crônica da aguda (Nockemann et al., 1998).

Em contrapartida, a maioria dos estudos que analisam o potencial antigênico das ESAs refere-se a proteínas recombinantes, na tentativa de distinguir entre infecções aguda e crônica. Dentre elas destacam-se as proteínas recombinantes provenientes dos grânulos densos (Cesbron-Delauw et al., 1989; Prince et al., 1989; Knapp et al., 1991; Mevelec et al., 1992; Jacobs et al., 1998; Redlich e Müller, 1998; Aubert et al., 2000; Li et al., 2000b; Suzuki et al., 2000; Beghetto et al., 2003); de superfície como as SAG1-p30 e SAG2-p22 (Burg et al., 1988; Parmley et al., 1992; Harning et

al., 1996; Aubert et al., 2000; Beghetto et al., 2003); das roptrias (Aubert et al., 2000; Knapp et al., 1991; Van Gelder et al., 1993); e dos micronemas (Beghetto et al., 2003). No entanto, Ferrandiz et al. (2004) ressaltam que embora as proteínas recombinantes pareçam ser promissoras para o diagnóstico da toxoplasmose, seu desempenho necessita ser melhorado, talvez com o uso de um coquetel de antígenos recombinantes.

Os dados abordados nesta introdução revelam que apesar dos avanços em diferentes seguimentos da toxoplasmose, algumas questões não estão totalmente esclarecidas e necessitam de estratégias mais eficazes. Na toxoplasmose cerebral, a PCR e as técnicas por imagens constituem diagnósticos altamente sensíveis, mas caros para grande parte de centros hospitalares em países em desenvolvimento. A utilização do diagnóstico sorológico, apesar dos resultados contraditórios, parece ser um recurso a ser considerado em pacientes com suspeita ou risco de toxoplasmose cerebral. Diferentes estudos mostraram que as proteínas que compõem as ESAs de *T. gondii* são altamente imunogênicas e importantes marcadores sorológicos, porém quando utilizadas separadamente falham na sensibilidade ou especificidade.

Devido à importância de um maior conhecimento nas abordagens que avaliam as lesões focais cerebrais da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids, o estudo de novas metodologias imunológicas, como as baseadas nas proteínas ESAs de *T. gondii*, pode aperfeiçoar os recursos diagnósticos atualmente disponíveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar e aperfeiçoar a recuperação e utilização das proteínas excretadas/secretadas por *Toxoplasma gondii* como antígeno em métodos imunológicos para auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids em comparação com a sorologia convencional.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Aperfeiçoar a recuperação das ESAs de *T. gondii* (*in vitro*) para uso no diagnóstico imunológico da toxoplasmose;
- 2- Avaliar o emprego das proteínas ESAs no diagnóstico sorológico da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids;
- 3- Comparar os resultados encontrados com a sorologia convencional.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Para a realização deste trabalho foram analisados 300 soros de pacientes maiores de 18 anos, encaminhados ao Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz para a realização do diagnóstico molecular e/ou sorológico da toxoplasmose. Os soros foram divididos em três grupos:

Grupo I: 106 soros de pacientes com toxoplasmose cerebral e aids (56% do sexo masculino e 44% do feminino) admitidos e tratados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, Brasil, com diagnóstico sorológico positivo para HIV e valores de células T CD4⁺ <200/μl. O diagnóstico da toxoplasmose cerebral foi adaptado de acordo com as “*definições de diagnóstico clínico-radiológico de toxoplasmose cerebral em pacientes com aids*” (CDC, 1993; Potergies et al., 2004). Os critérios diagnósticos utilizados foram: 1) pacientes com presença de sinais neurológicos focais, alterações do nível ou do conteúdo da consciência, evidência de imagem tomográfica de lesão expansiva, com ou sem realce após a administração da substância de contraste; 2) presença de reações sorológicas (ELISA e RIFI) e/ou PCR positivos usando os iniciadores B22 e B23 do gene B1 de *T. gondii* (Colombo et al., 2005) e 3) resposta clínica e radiológica ao tratamento específico anti-*T. gondii*.

Grupo II: 99 soros de indivíduos (51% do sexo masculino e 48% do feminino) soropositivos para toxoplasmose (IgM negativo, IgG positivo e avidéz alta) diagnosticados por ELISA e RIFI, excluindo-se pela suspeita clínica e triagem da Instituição de origem, os soros suspeitos de HIV positivo.

Grupo III: 95 soros de indivíduos sadios (58% do sexo masculino e 42% do feminino) com reações sorológicas (ELISA e RIFI) negativas para toxoplasmose.

3.1.1. Considerações éticas

Todos os pacientes ou seus representantes legais incluídos neste estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) (Anexo 1) e Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (Anexo 2).

3.1.2. Obtenção das amostras de sangue

Foram coletados 5 ml de sangue em tubo seco de cada paciente. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 1800 g para a obtenção de soro. Após a realização do diagnóstico sorológico, os soros foram conservados (v/v) em glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato 0,5M pH 8.5 e acondicionados a -20°C até o momento do uso. Todas as amostras de sangue dos pacientes do Grupo I foram coletadas antes ou até o terceiro dia de terapia específica para toxoplasmose. Os soros dos Grupos II e III foram gentilmente cedidos pelo Setor de Toxoplasmose do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

3.2. Animais experimentais e *T. gondii*

3.2.1. Manutenção e obtenção dos parasitas

3.2.1.1. Taquizoítos peritoniais

Foram utilizados taquizoítos da cepa RH, tipo I, altamente virulenta, não cistogênica e de multiplicação rápida (Sabin e Feldman, 1948), gentilmente cedida pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de

Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Os parasitas foram mantidos em camundongos machos da linhagem Swiss, com 25 a 30 dias de vida, por via intraperitoneal com 1×10^5 taquizoítos/animal. Após quatro dias de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e foram feitas lavagens intraperitoneais com 5 ml/animal de NaCl 0,85% estéril para a retirada dos taquizoítos. Posteriormente, foi feita a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e acertada a concentração desejada. Esses parasitas foram utilizados para a manutenção da cepa através de passagem para um novo grupo de animais, para a preparação dos antígenos e infecção das culturas de células.

3.2.1.2. Taquizoítos provenientes de culturas celulares

Culturas de células VERO (ATCC CCL – 81), gentilmente cedidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz/SP foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em garrafas de 75cm³ (Corning) com 10 ml de meio Eagle's (Gibco) contendo 292 mg/l de L-glutamina, 110 mg/l de piruvato de sódio, 1,0 g/l de glicose, 2,2 g/l de bicarbonato de sódio, 100 000 U/l de penicilina, 133 mg/l de estreptomicina complementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab). Após a formação da monocamada de células por volta de 48 horas de incubação, as garrafas foram lavadas três vezes com meio sem adição de SFB para a eliminação de resquícios do mesmo. A seguir foram adicionados 10 ml do mesmo meio e as células infectadas com 1×10^7 taquizoítos provenientes de camundongos ou de outra garrafa infectada. Após 48 horas de incubação, coletou-se o sobrenadante contendo taquizoítos e realizou-se a contagem dos parasitas em Câmara de Neubauer. Quando necessário, a concentração de parasitas foi acertada para a infecção de uma nova garrafa e o sobrenadante utilizado para a produção de antígeno.

3.3. Obtenção de antígenos de *T. gondii*

3.3.1. Taquizoítos formalizados para RIFI

Um lote de 35 camundongos recebeu, por via intraperitoneal, 1×10^5 taquizoítos/animal. Após 4 dias, os parasitas foram retirados como descrito no item 3.2.1.1. e centrifugados por 15 minutos a 1800 *g*. Após o descarte do sobrenadante, os parasitas foram lavados por três vezes com 40 ml de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0.01M pH 7.2 por 15 minutos a 1800 *g*. Por fim, foi adicionado 1ml de PBS ao sedimento, contendo os parasitas. Em seguida, adicionou-se Formol 2% em PBS pH 7.2 na proporção de 1:1 e incubou-se por 30 minutos a 37°C. O sobrenadante foi desprezado após uma centrifugação por 15 minutos a 2800 *g*. O sedimento foi dissolvido em NaCl 0.85%, até que se obtivesse 20 a 30 taquizoítos por campo em microscopia com aumento de 400 vezes. O antígeno (20 µl/orifício) foi distribuído em lâminas de imunofluorescência e, deixadas secar naturalmente em temperatura ambiente. As lâminas secas foram embrulhadas em papel vegetal, acondicionadas em papel alumínio e posteriormente conservadas em freezer a -20°C até o momento do uso.

3.3.2. Antígeno bruto de taquizoítos

3.3.2.1. Para o ensaio imunoenzimático (ELISA)

Conforme descrito no item 3.2.1.1., após quatro dias de infecção, os parasitas foram retirados e centrifugados por 15 minutos a 1800 *g*. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e os parasitas foram lavados por três vezes com 40 ml de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0.01M pH 7.2 por 15 minutos a 1800 *g*. Os taquizoítos foram filtrados em membranas com poros de 3µm de diâmetro (Millipore, USA). Por fim, foi adicionado 1ml de água destilada ao sedimento, contendo os parasitas. A

suspensão foi colocada em banho de gelo, e os parasitas rompidos por ultrassom (Sonic Dismembrator Quigley, USA). Foram feitos 10 ciclos (1,0 A/ min) por 5 minutos com intervalos de 2 minutos. A integridade dos parasitas foi observada periodicamente por microscopia (400X) nos intervalos dos ciclos. Após a certificação da lise dos protozoários, acrescentou-se 3 ml de solução de NaCl 0,3 M para isotonzar a suspensão e centrifugou-se a 10.000 g por 30 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno (Camargo et al., 1978). As concentrações protéicas foram determinadas por espectrofotometria UV a 280 nm conforme descrito no item 3.3.4. O antígeno foi aliquotado e estocado a -70°C. Para as reações, o antígeno bruto foi utilizado na concentração de 1µg/ml de bicarbonato de sódio 0,1 M pH 8.5 (50 µl/orifício).

3.3.2.2. Para o western blotting

Lotes de 1×10^7 taquizoítos provenientes de cultura de células foram filtrados em membranas com poros de 3µm de diâmetro (Millipore, USA), concentrados e lavados por três vezes com 1 ml PBS pH 7.2 por 5 minutos a 2800 g. Os sedimentos foram diluídos em 50 µl de tampão de amostra contendo SDS 2%; glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 60 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,002%, incubados por 3 minutos a 100°C e aplicados 20µl nas canaletas dos géis de empilhamento.

3.3.3. ESAs

Algumas etapas na recuperação e no processamento das ESAs utilizadas nos ensaios de ELISA e western blotting foram previamente padronizadas e estão descritas na sequência.

Todos os parâmetros testados foram analisados pelo perfil eletroforético por SDS-PAGE 10% após coloração por Coomassie Azul Brillhante. Foram analisados o período de recuperação, a adição de

inibidores de proteases, aquecimento e o período máximo de armazenamento das proteínas estocadas a cada lote produzido.

Os sobrenadantes das culturas celulares infectadas por *T. gondii* (preparados como descrito no item 3.2.1.2.) foram colhidos em diferentes tempos após infecção (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 horas). A seguir, os parasitas foram filtrados em membranas com poros de 0,22µm de diâmetro (Millipore, USA) e removidos por duas centrifugações (2800 g por 10 minutos). O sobrenadante livre de taquizoítos foi testado quanto à necessidade de se adicionar 10µg/ml de um coquetel de inibidores de proteases contendo por ml AEBSF 20µM; EDTA 10µM; Bestatin 1,3µM; E-64 0,14µM; Leupeptin 10 nm e Aprotinin 3 nm (Sigma) e verificado após diferentes tempos de incubação à 4°C (1 hora, 5, 10, 20 e 30 dias).

A seguir as proteínas recuperadas foram concentradas em Speed Vac (RC 10.09 - Jouan) por 4 horas e o concentrado final foi colocado em saco de diálise com poros que retém moléculas com massa molecular superiores a 12 kDa (Sigma) e dialisado contra PBS, pH 7,2 a 4°C por aproximadamente 18 horas. A seguir, as proteínas foram aliqüotadas e armazenadas até o momento do uso. O tempo máximo de armazenamento das ESAs foi determinado pela análise de amostras armazenadas a -20°C por diferentes períodos (1 hora, 1, 2, 4 e 6 meses) após a recuperação.

3.3.4. Dosagem protéica

As concentrações protéicas foram determinadas pela absorção da luz ultravioleta das soluções, em comprimento de onda a 280 nm, em espectrofotômetro de duplo feixe (Hach DR 4000, Hach Company, USA).

3.3.5. Eletroforese vertical das proteínas

A eletroforese vertical foi realizada em gel de acrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) como descrita por Laemmli (1970), em equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, USA). Em todos os ensaios, o gel de

separação (Tris-HCl 0.75 M; SDS 0.2%, pH 8.8) foi utilizado na concentração 10% de acrilamida. O gel de empilhamento (Tris-HCl 0,25 M; SDS 0,2%, pH 6.8) foi usado na concentração de 5%. Os géis foram feitos com espessuras de 1 mm. As amostras analisadas foram diluídas em tampão de amostra (SDS 2%; glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 60 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,002%). Posteriormente, foram testadas quanto ao aquecimento por 3 minutos a 100°C e aplicados 20 µl nas canaletas do gel de empilhamento. Os eletrodos foram mergulhados no tampão contendo Tris-HCl 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1% e aplicados numa voltagem constante de 200 V. Os géis foram corados por Coomassie Azul Brilhante R250 (Sigma) 0,15%; etanol 40%; ácido acético 10% durante 20 minutos e descorados em etanol 40%; ácido acético 10% até que as bandas ficassem distinguíveis. Em todos os experimentos foram colocados na primeira canaleta do gel 10 µl do padrão de peso molecular para proteínas (5.7, 13.7, 18.3, 24.9, 35.1, 47.2, 60.4, 78.9, 109.5 e 170.8 kDa) (Bench Mark Pré-Stained Protein Ladden – Invitrogen).

3.4. Diagnóstico

3.4.1. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

As reações foram realizadas no Setor de Toxoplasmose do Instituto Adolfo Lutz como previamente descrito por Camargo e Leser (1976). Os soros foram diluídos nas concentrações 1:16, 1:256, 1:1024, 1:2048 e 1:4096 e acrescentados, num volume de 20 µl, em lâminas de imunofluorescência. A seguir, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C e, posteriormente, lavadas com PBS pH 7.2 por dois períodos de 10 minutos. As lâminas foram secas suavemente com papel de filtro, e sobre os orifícios foram acrescentados 20 µl de uma globulina anti-IgG humana marcada com fluoresceína (Biolab-Merieux) diluído 1:200 em Azul de Evans 0,05% PBS pH 7.2. Após nova incubação

em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, as lâminas foram novamente lavadas por 2 vezes com PBS pH 7.2. A seguir, foram secas e receberam uma fina camada de glicerina tamponada com PBS pH 7.2 e foram recobertas com lamínula. As leituras foram feitas em microscópio de fluorescência (Nikon) em aumento de 400 vezes e o “cut-off” foi considerado na diluição de 1:16.

3.4.2. ELISA

As ELISAs foram realizadas utilizando-se dois antígenos: o “antígeno bruto”, conforme descrito no item 3.3.2.1 (comumente utilizado no diagnóstico sorológico da toxoplasmose) e as “ESAs”, descrito no item 3.3.3. Todas as etapas da reação foram previamente padronizadas e estão descritas na sequência.

As padronizações da reação foram realizadas utilizando as ESAs. Os parâmetros estudados foram os tipos de microplaca; pH e concentração do antígeno; diluições dos soros e do segundo anticorpo marcado com peroxidase. Em todas as reações os soros foram testados em duplicata e compunham um painel de 30 soros padrões conhecidos (10 indivíduos normais com sorologia negativa para toxoplasmose; 10 soropositivos para toxoplasmose e 10, com toxoplasmose cerebral).

O tipo de microplaca foi definido testando-se placas escavadas de fundo chato com 96 orifícios “high binding” (Costar) e “low binding” (Corning). O antígeno foi diluído em série (1:10 – 1:80) em Tampão bicarbonato de sódio 0.1M pH 8.5. O pH do antígeno para adsorver nas placas foi determinado testando-se três tampões: tampão citrato (fosfato de sódio dibásico 0,1M e ácido cítrico 0,1M) pH 4.0; Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0.01M pH 7.2 e tampão bicarbonato de sódio 0.1M pH 8.5. Em todos os testes, as placas foram sensibilizadas pelo antígeno incubando-se por 18 horas a 4°C num volume de 50 µl/ orifício. A seguir, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS 0,05%-Tween 20 e os orifícios bloqueados

com 100 µl de PBS-leite desnatado 5% por 30 minutos em temperatura ambiente.

A concentração dos soros foi determinada por diluições seriadas de 1:50 - 1:400 em PBS-leite desnatado 5%. Os soros diluídos foram adicionados nos orifícios da placa, em duplicata, num volume de 50 µl e incubados por 60 minutos a 37°C. A seguir, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS 0,05%-Tween 20. A concentração do segundo anticorpo marcado com peroxidase (IgG de cabra anti-IgG humana conjugada à peroxidase - Sigma) foi determinada por diluições seriadas de 1:2500 - 1:20000 em PBS-leite desnatado 5% e adicionado 50 µl/ orifício. As placas foram incubadas por mais 60 minutos a 37°C e, novamente lavadas 5 vezes com PBS 0,05%-Tween 20. A revelação ocorreu com a adição de 100 µl do substrato enzimático contendo 0,5 mg/ml de OPD (orto-fenilenodiamina) diluído em fosfato de sódio dibásico 0,1M pH 4.5; ácido cítrico 0,1M; H₂O₂ 0,1% por 30 minutos em câmara escura, a 37°C. A reação foi interrompida adicionando 50 µl de H₂SO₄ 4 N. Os resultados gerados, independente do antígeno utilizado foram analisados em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan) em comprimento de onda de 492 nm. Foram calculadas as médias dos valores em densidade óptica (D.O.) dos soros testados em duplicatas. Em cada ensaio foi incluído um painel de 20 soros negativos para o cálculo do “cut-off”, que foi determinado para cada reação de forma independente.

3.4.3. Western blotting

As ESAs e o lisado bruto foram fracionados em géis SDS-PAGE 10% como descrito no item 3.3.5. Inicialmente padronizou-se a quantidade de proteína a ser aplicada no gel para posterior transferência para as membranas de nitrocelulose. Foram testadas as seguintes concentrações: 4,8µg; 9,6µg; 14,4µg; 19,2µg; 24µg e 28,8µg em tampão de amostra. Em seguida, procedeu-se a transferência eletroforética das proteínas dos géis para as membranas de nitrocelulose (com poros de 0,45 µm de diâmetro – BioRad) no equipamento Trans-Blot System (BioRad), conforme descrito por

Towbin et al. (1979). Após o posicionamento e montagem dos géis, a transferência foi efetuada em voltagem constante de 15 V por 60 minutos em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM; glicina 0,192 M; metanol 20%, pH 8.2). Ao final da transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas por 0,2% de Ponceau-S [ácido 3-hidroxil-4-(2-sulfo-fenilazo)-2,7-naftalenodisulfônico] (Sigma) em ácido tricloroacético 3% (Merck) por 5 minutos para confirmação da transferência efetiva das proteínas. As membranas foram, então, incubadas com PBS-leite desnatado 5% pelo período de 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação, seguidos de 3 lavagens com PBS (5 minutos). A diluição dos soros foi padronizada por diluições seriadas (1:20, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) em PBS-leite desnatado 5% incubando as membranas por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Após mais três lavagens com PBS (5 minutos), as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação com IgG de cabra anti-IgG humana conjugada a peroxidase (Sigma) em diluições seriadas (1:250, 1:500, 1:750 e 1:1000) em PBS-leite desnatado 5%, seguindo-se, então, um novo ciclo de lavagens. A revelação das bandas foi efetuada cobrindo-se as membranas em aproximadamente 5 ml de 4-cloro-1-naftol 0,3% (Sigma) em metanol; Tris-HCl 50 mM, pH 7.6; H₂O₂ 0,1%. Após o desenvolvimento da cor desejada, o tampão foi removido e as membranas lavadas com PBS.

3.5. Análise de dados

Nos ensaios de ELISA, a partir do cálculo do “cut-off” foi calculado o Valor Relativo (VR), que representa o quociente entre a absorbância demonstrada pela amostra e a absorbância do “cut-off” obtido pelos controles negativos dos ensaios (D.O. do soro / D.O. cut-off). Os soros que apresentaram média superior ao “valor relativo” (>1) foram considerados positivos ao passo que os soros que apresentaram média inferior (<1) foram considerados negativos (Pereira-Chioccola et al., 2003; Borges, 2005; Souza et al., 2005). A análise estatística dos resultados foi realizada pelos

seguintes métodos: As variâncias foram calculadas pelo Teste F e Anovafator único. O grau de similaridade entre os diferentes grupos de soros foi calculado pelo Teste "*T de Student*". Os testes foram analisados no programa "Microsoft Office Excell 2007".

4. RESULTADOS

4.1. Padronizações

4.1.1. Antígeno - ESAs

Conforme mencionado em Materiais e Métodos, antes do emprego das ESAs como antígeno foi necessário realizar uma série de padronizações. Os primeiros experimentos visaram determinar o tempo necessário para recuperar as ESAs. Amostras de sobrenadantes foram coletadas em diferentes tempos, iniciando-se com 30 minutos, seguidas de 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 horas após a infecção das células com 1×10^7 taquizoítos. A seguir, as amostras foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE 10%. Como mostra a Figura 4, trinta minutos pós-infecção já foi possível observar a presença das ESAs (canaleta A), pois são liberadas pelos taquizoítos logo nos primeiros minutos de infecção para penetrar na célula hospedeira. A concentração protéica máxima foi observada por volta de 48 horas (canaleta H). Após 72 horas ocorreu a lise dos parasitas e da monocamada de células. A partir deste experimento, as ESAs foram recuperadas a partir de sobrenadantes coletados 48 horas pós-infecção.

Cada lote de ESA recuperado foi alíquotado e armazenado a -20°C até o momento do uso. No entanto, determinou-se o tempo máximo de armazenamento dessas alíquotas, para que não houvesse desnaturação e comprometimento dos resultados obtidos nos testes imunológicos. Analisamos amostras armazenadas a -20°C por um período máximo 6 meses. As alíquotas foram colhidas e analisadas por SDS-PAGE 10% em diferentes tempos de armazenamento: 1 hora, 1, 2, 4 e 6 meses. Após a coloração por Coomassie Azul Brilhante observou-se um perfil de bandas visíveis (Figura 5). Nas amostras com 1 hora, 1 e 2 meses de armazenamento não observamos diferenças quanto ao perfil de bandas apresentadas (canaletas A, B e C), ao passo que, as amostras armazenadas por 6 meses apresentaram bandas mais fracas em relação as demais

amostras (canaleta E). Este experimento revelou que o armazenamento das ESAs por período superior a 4 meses a -20°C não é aconselhável, pois pode ocorrer a desnaturação de algumas proteínas comprometendo a sua capacidade antigênica.

Outro parâmetro analisado foi a interferência dos inibidores de proteases. Eles foram adicionados aos sobrenadantes contendo as ESAs com objetivo de inibir as proteases produzidas por taquizoítos para penetrar na célula (Carruthers e Blackman, 2005; Carruthers, 2006). Lotes de ESAs foram tratados ou não com um coquetel de inibidores de proteases (10µm/ml) à 4°C. Após 1 hora, 5, 10, 20 e 30 dias de incubação, alíquotas foram colhidas e analisadas por SDS-PAGE 10%. Como mostra a Figura 6, o perfil eletroforético das amostras após coloração por Coomassie Azul Brilhante revelou que não houve diferença na intensidade das bandas em amostras analisadas com (A) ou sem inibidores de proteases (B). Contudo, ressaltamos a importância da adição de inibidores de proteases para que o antígeno mantenha-se estável por mais tempo.

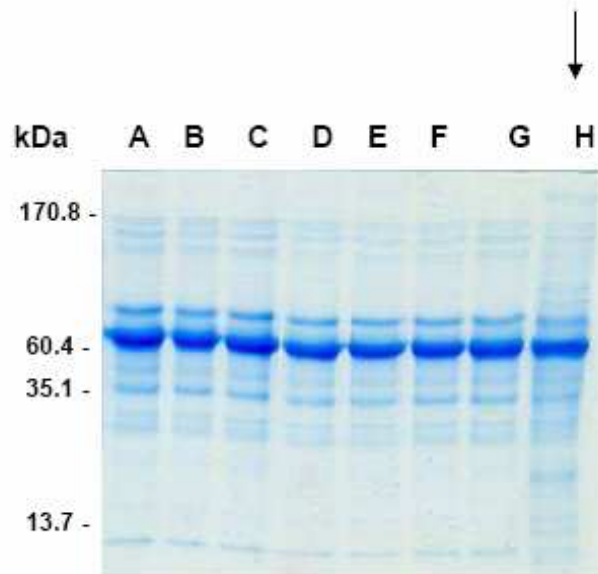


Figura 4. Gel SDS-PAGE 10%, corado por Coomassie Azul Brilhante, contendo amostras de ESAs obtidas a partir de sobrenadantes de culturas celulares infectadas por *T. gondii* retirados após: 30 minutos (**canaleta A**); 1h (**canaleta B**); 2h (**canaleta C**); 4h (**canaleta D**); 8h (**canaleta E**); 16h (**canaleta F**); 24h (**canaleta G**) e 48h (**canaleta H**). Em todas as canaletas foram aplicados 20 μ l. A seta indica o período escolhido.

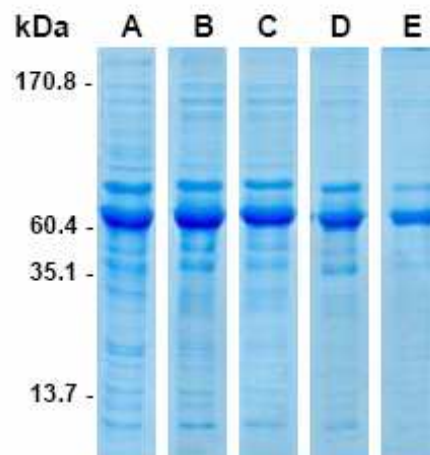


Figura 5. Gel SDS-PAGE 10%, corado por Coomassie Azul Brilhante, contendo amostras de ESAs obtidas a partir de sobrenadantes de culturas de células infectadas por *T. gondii* e armazenadas a -20°C por: 1 hora (**canaleta A**); 1 mês (**canaleta B**); 2 meses (**canaleta C**); 4 meses (**canaleta D**) e 6 meses (**canaleta E**). Em todas as canaletas foram aplicados 20 μ l.

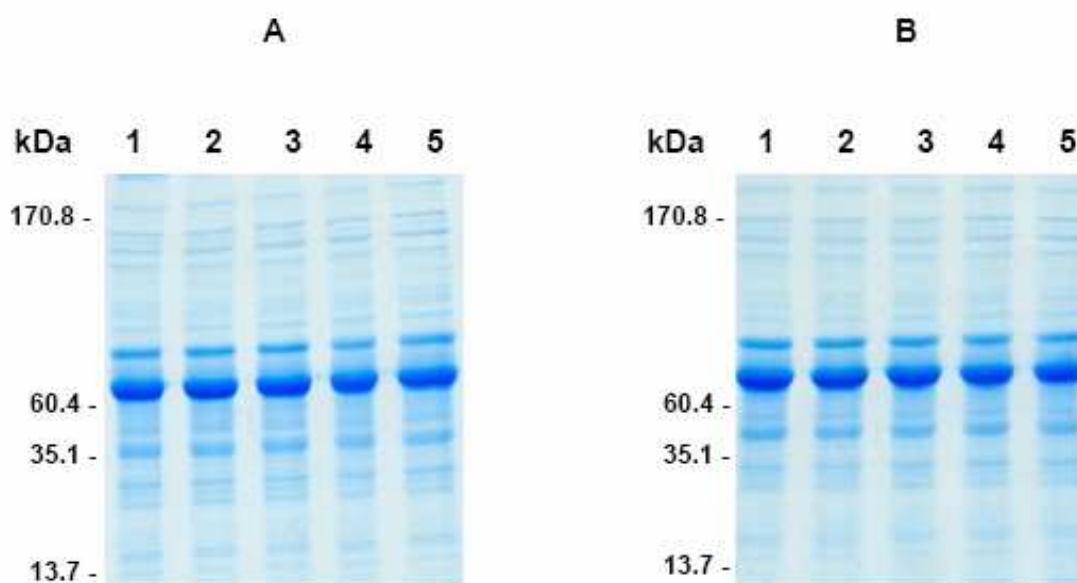


Figura 6. Gel SDS-PAGE 10%, corado por Coomassie Azul Brilhante, contendo amostras de ESAs obtidas a partir de sobrenadantes de culturas celulares infectadas por *T. gondii* com inibidores de proteases (**A**) e sem inibidores de proteases (**B**) após: 1 hora (**canaleta 1**); 5 dias (**canaleta 2**); 10 dias (**canaleta 3**); 20 dias (**canaleta 4**) e 30 dias (**canaleta 5**). Em todas as canaletas foram aplicados 20 μ l.

4.1.2. ELISA

O primeiro parâmetro analisado foi o tipo de microplaca a ser utilizada nas reações. Testamos dois tipos, as de alta e as de baixa afinidade. Ambas foram sensibilizadas com as ESAs em diluições seriadas de 1:10 - 1:80. Nas placas de alta afinidade, os soros apresentaram alta reatividade em relação ao antígeno com médias de D.O.s acima de 1.7 (toxoplasmose cerebral); 0.5 (soropositivos) e 0.04 (negativos) (Figura 7A). Decidimos, então para o uso das placas de baixa afinidade onde os soros apresentaram menor reatividade, com médias de 1.1 (toxoplasmose cerebral e aids); 0.3 (soropositivos) e 0.003 (negativos) (Figura 7B).

Em seguida, analisamos o pH ideal do antígeno. Testamos três tampões com diferentes pHs: tampão citrato pH 4.0; PBS pH 7.2 e tampão bicarbonato de sódio pH 8.5. O antígeno foi então diluído em cada um dos tampões e adsorvidos nas placas em diluições seriadas de 1:10-1:1280. A seguir, a reação foi realizada utilizando-se o painel de soros. Como mostra a Figura 8, os tampões com pHs 7.2 e 8.5 apresentaram resultados similares nas diferentes diluições do antígeno e soros de todos os grupos (A: negativos, B: soropositivos e C: toxoplasmose cerebral). No entanto, observamos uma queda de títulos no grupo daqueles com toxoplasmose cerebral quando utilizamos o tampão citrato pH 4.0. Optamos, então, pelo uso do tampão bicarbonato de sódio 0.1M pH 8.5.

Apesar das várias lavagens das garrafas de culturas de células com meio sem adição de soro fetal bovino, prévia à infecção por *T. gondii* observamos a presença de albumina bovina (67 kDa) nos preparados protéicos por SDS-PAGE 10%. Diante deste fato, não foi possível dosar as concentrações protéicas, pois teríamos a interferência da albumina. Desta forma, as concentrações de cada lote de ESA foram determinadas por diluições seriadas de 1:10 - 1:80 em tampão bicarbonato de sódio 0.1M pH 8.5 ensaiando-se os soros do painel descrito no item 3.4.2.

A Figura 9 mostra os resultados do lote 6 que apresentou melhores resultados na diluição 1:40. As médias das D.O.s foram de 0.04

(negativos), 0.4 (soropositivos) e 1.3 (toxoplasmose cerebral). Nas outras diluições as D.O.s apresentaram algumas discrepâncias, principalmente na diluição 1:80 onde obtivemos a total negatificação dos soros. Assim, neste lote, para procedermos as reações, o antígeno foi diluído a 1:40.

A próxima etapa foi a de estabelecer a concentração dos soros e a do segundo anticorpo marcado com peroxidase. Ambos foram determinados realizando-se diluições seriadas. Os soros foram diluídos de 1:50 - 1:400 em PBS-leite desnatado 5%, conforme protocolo descrito no item 3.4.2. (Figura 10). O segundo anticorpo marcado com peroxidase, neste ensaio foi utilizado na concentração 1:10000. Nas duas primeiras diluições (1:50 e 1:100), os soros apresentaram médias de D.O.s superiores a 1.7 (toxoplasmose cerebral); 1.1 (soropositivos) e 0.1 (negativos), sendo consideradas muito altas principalmente no que diz respeito aos grupos dos pacientes soropositivos e negativos. Já na diluição 1:200, as médias encontradas foram menores e consideradas ideais em relação aos soros padrões. As médias foram de 1.2 (toxoplasmose cerebral); 0.4 (soropositivos) e 0.02 (negativos).

O segundo anticorpo marcado com peroxidase seguiu diluições de 1:2500 - 1:20000, em PBS-leite desnatado 5%. Os soros padrões foram então diluídos a 1:200 neste ensaio. Nas diluições 1:2500 e 1:5000, as médias das D.O.s apresentaram reatividades altas chegando a 2.8 e 1.9 (toxoplasmose cerebral); 2.1 e 1.2 (soropositivos) e 0.2 e 0.1 (negativos), respectivamente (Figura 11). Ao passo que, na diluição 1:10000, as médias se mostraram uniformes em relação a estes grupos de soros padrões. As médias foram de 1.1 (toxoplasmose cerebral); 0.4 (soropositivos) e 0.02 (negativos). Na diluição 1:20000 observamos uma queda acentuada de títulos nos três grupos de soros padrões, com médias de 0.5 (toxoplasmose cerebral); 0.3 (soropositivos) e 0.01 (negativos).

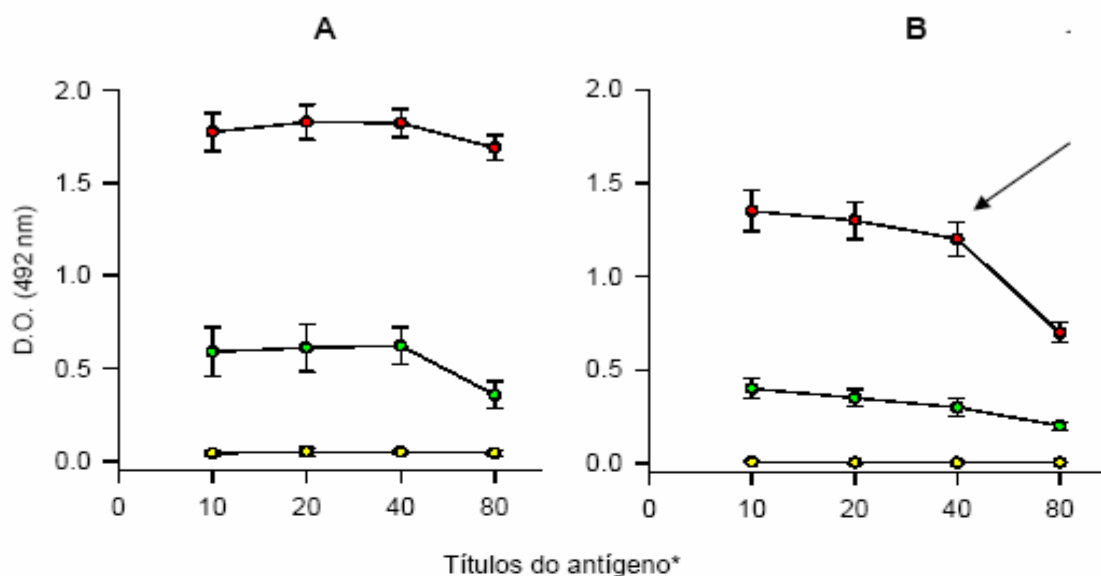


Figura 7. ELISA: análise do tipo de microplaca. As placas de alta (A) e baixa afinidade (B) foram sensibilizadas com as ESAs e incubadas com: 10 soros negativos (amarelo), 10 soros soropositivos (verde) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho). Os resultados representam as médias \pm 2DP das D.O.s a 492 nm de 10 soros por grupo. *Cada título corresponde ao inverso da diluição. A seta indica a placa escolhida.

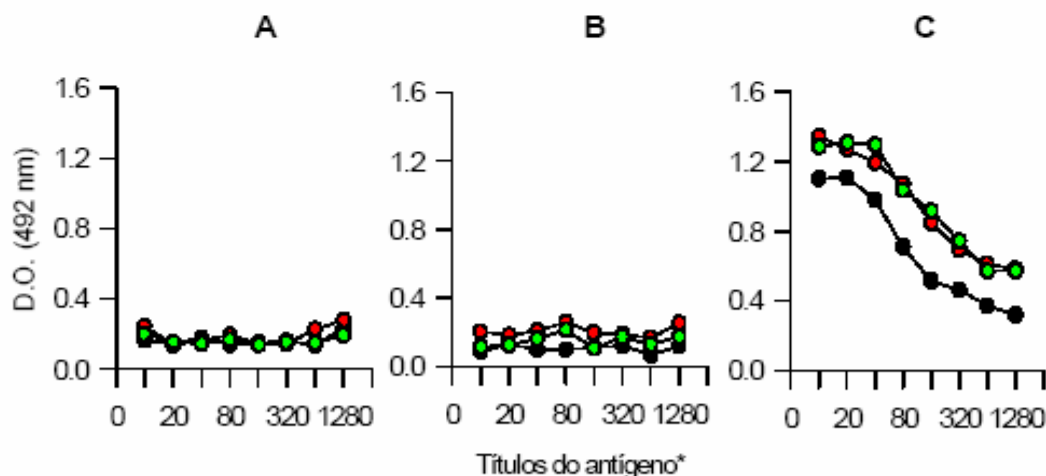


Figura 8. ELISA: análise do pH do antígeno. As placas foram sensibilizadas com as ESAs (diluições seriadas) em tampão citrato pH 4.0 (preto), PBS pH 7.2 (verde), e tampão bicarbonato de sódio pH 8.5 (vermelho). A seguir, foram incubadas com: 10 soros negativos (A), 10 soros soropositivos (B) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (C). *Cada título corresponde ao inverso da diluição.

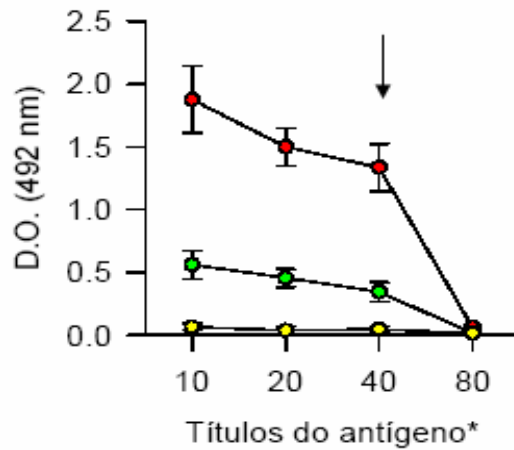


Figura 9. ELISA: determinação da concentração de ESAs. As placas foram sensibilizadas com as ESAs (diluições seriadas) em tampão bicarbonato de sódio e incubadas com: 10 soros negativos (amarelo), 10 soros soropositivos (verde) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho). Os resultados representam as médias \pm 2DP das D.O.s a 492 nm de 10 soros por grupo. A seta representa a diluição escolhida nas reações. *Cada título corresponde ao inverso da diluição.

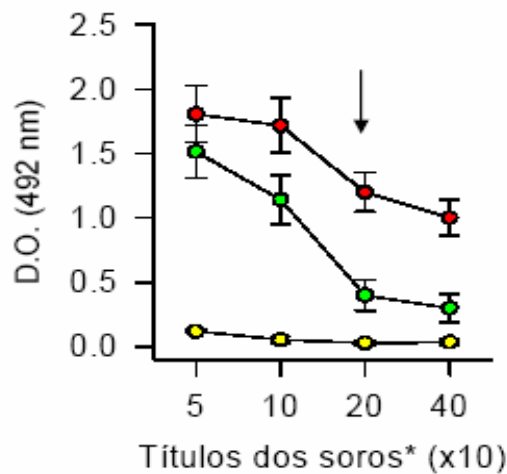


Figura 10. ELISA: determinação do título dos soros. As placas foram sensibilizadas com as ESAs e incubadas com 10 soros negativos (amarelo), 10 soros soropositivos (verde) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho) em diluições seriadas. Os resultados representam as médias \pm 2DP das D.O.s a 492 nm de 10 soros por grupo. A seta representa o título utilizado nas reações. *Cada título corresponde ao inverso da diluição.

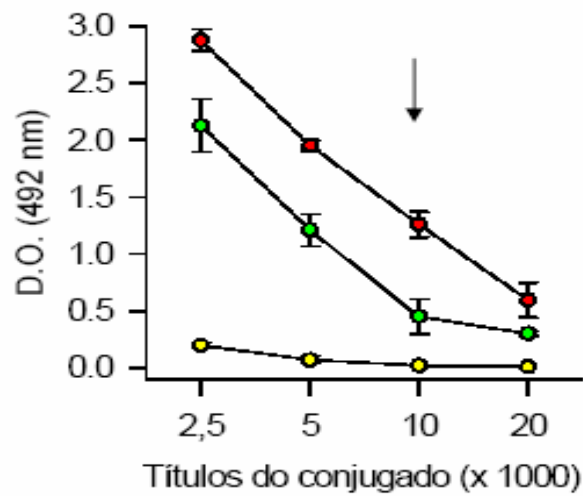


Figura 11. ELISA: determinação do título do conjugado. As placas foram sensibilizadas com as ESAs e incubadas com 10 soros negativos (amarelo), 10 soros soropositivos (verde) e 10 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho) na diluição 1:200. A seguir, foram incubadas com o segundo anticorpo marcado com peroxidase em diluições seriadas. Os resultados representam as médias \pm 2DP das D.O.s a 492 nm de 10 soros por grupo. A seta representa a diluição utilizada nas reações. *Cada título corresponde ao inverso da diluição.

4.1.3. Western blotting

Para analisar se a reatividade e o perfil de bandas obtidos das ESAs e do lisado bruto de taquizoítos poderiam ser alterados com desnaturação pela fervura, ambas as situações foram analisadas em SDS-PAGE 10%. Como mostra a Figura 12, não foram observadas diferenças significativas ao compararmos a disposição das bandas das proteínas em ambas as amostras, porém as bandas das amostras fervidas mostraram-se mais visíveis após coloração (canaletas B e D).

A quantidade de proteína a ser aplicada no gel e posteriormente transferida para as membranas de nitrocelulose também foi avaliada. Diferentes concentrações das ESAs (4,8 µg, 9,6 µg, 14,4 µg, 19,2 µg, 24 µg e 28,8 µg) diluídas em tampão de amostra (4:1) foram fracionadas em SDS-PAGE 10% (Figura 13). A análise eletroforética após coloração revelou que concentrações entre 19 µg a 30 µg (canaletas D, E e F) seriam necessárias para uma boa transferência para a nitrocelulose.

As concentrações séricas e do segundo anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase foram determinadas por diluições seriadas em PBS-leite desnatado 5%, conforme protocolo descrito no item 3.4.3. Os soros com toxoplasmose cerebral diluídos a 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, apresentaram boa reatividade a partir da diluição 1:50 (Figura 14, canaleta B). O excesso de anticorpos presentes causou o efeito pró-zona, (baixa reatividade em relação ao antígeno) na diluição 1:20 (Figura 14, canaleta A). O segundo anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase diluído a 1:250; 1:500; 1:1000; 1:1500, apresentou reatividade ideal na diluição 1:500 (Figura 15, canaleta B). As diluições seguintes apresentaram baixa reatividade com fraca exibição de algumas bandas (canaletas C e D).

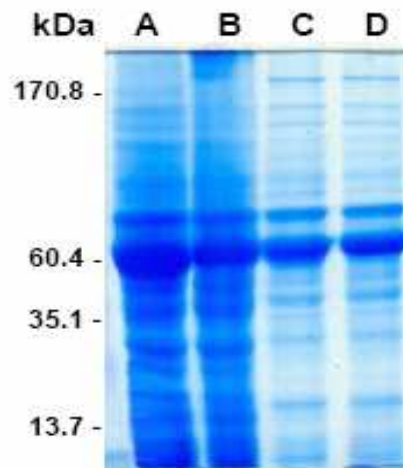


Figura 12. Gel SDS-PAGE 10%, corado por Coomassie Azul Brilhante, contendo antígeno bruto de taquizoítos (**canaletas A e B**) e ESAs (**canaletas C e D**). Ambos foram dissolvidos em tampão de amostra na proporção de 4:1 (ESAs) e $50\mu\text{l}/1.10^7$ taquizoítos (antígeno bruto) e aplicados $20\mu\text{l}$ no gel de empilhamento. As amostras das canaletas B e D foram aquecidas por 3 minutos a 100°C . Em todas as canaletas foram aplicados $20\mu\text{l}$.

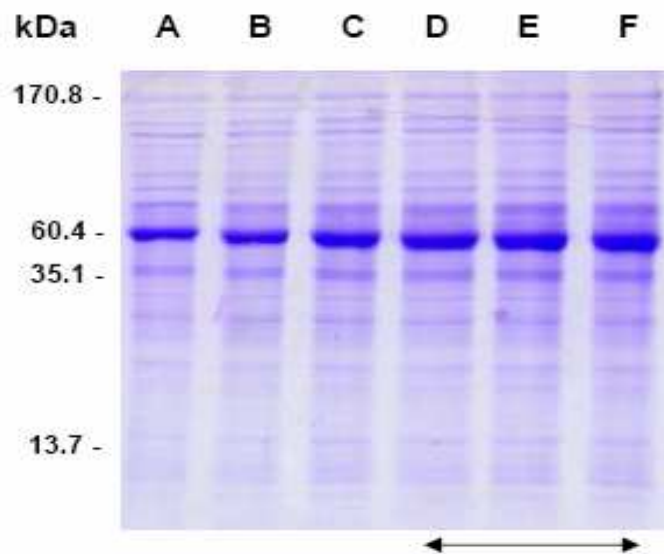


Figura 13. Determinação da concentração protéica para transferência para membrana de nitrocelulose. Gel SDS-PAGE 10% corado por Coomassie Azul Brilhante contendo amostras de ESAs obtidas a partir de sobrenadantes de culturas celulares infectadas por *T. gondii* em diferentes diluições: $4,8\mu\text{g}$ (**canaleta A**); $9,6\mu\text{g}$ (**canaleta B**); $14,4\mu\text{g}$ (**canaleta C**); $19,2\mu\text{g}$ (**canaleta D**); $24\mu\text{g}$ (**canaleta E**) e $28,8\mu\text{g}$ (**canaleta F**). Em todas as canaletas foram aplicados $20\mu\text{l}$. A seta representa a quantidade a ser utilizada.

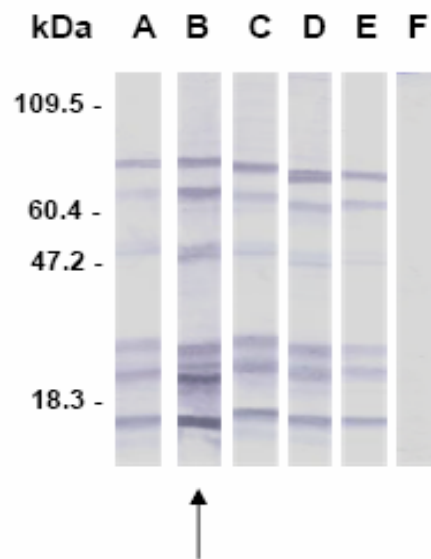


Figura 14. Western blotting: determinação do título dos soros. ESAs fraionadas em gel SDS-PAGE 10% foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com um soro com toxoplasmose cerebral nas diluições: 1:20 (**canaleta A**); 1:50 (**canaleta B**); 1:100 (**canaleta C**); 1:200 (**canaleta D**) e 1:400 (**canaleta E**) e com um soro negativo 1:50 (**canaleta F**). A seta indica o título utilizado nas reações.

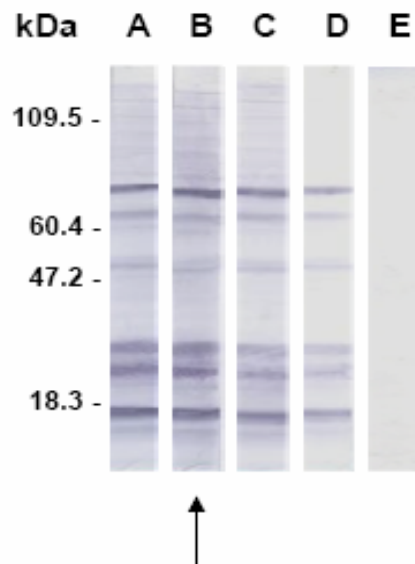


Figura 15. Western blotting: determinação do título do conjugado. ESAs fracionadas em gel SDS-PAGE 10% foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com um soro com toxoplasmose cerebral. Posteriormente foram incubadas com o segundo anticorpo nas diluições: 1:250 (**canaleta A**); 1:500 (**canaleta B**); 1:1000 (**canaleta C**); 1:1500 (**canaleta D**) e com um soro negativo (**canaleta E**). A seta indica o título utilizado nas reações.

4.2. Reatividade de anticorpos IgG na toxoplasmose crônica (soropositivos) e sintomáticos (toxoplasmose cerebral) frente aos antígenos formalizado, bruto de taquizoítos e ESAs

4.2.1. RIFI

Com objetivo de comparar os resultados de ELISA utilizando as ESAs (ESA-ELISA) com o diagnóstico sorológico convencional, inicialmente foram analisados os resultados obtidos pela RIFI nos três grupos de soros. Como mostra a Figura 16, dentre os 106 soros com toxoplasmose cerebral (Grupo I), 48,1% dos soros apresentaram títulos de 4096 ou superiores na RIFI. Os demais soros apresentaram títulos de 2048 (20,8%) e 1024 (14,2%). Uma pequena parcela do grupo apresentou títulos de 256 (11,3%) e seis soros (5,6%) apresentaram sorologia negativa. Já os soros do Grupo II, a maioria dos 99 soros apresentou títulos de 256 (59%). O restante foi distribuído em títulos maiores como 1024 (23%), 2048 (15%) e 4096 (2%). Todos os soros do Grupo III (soros de sadios) foram negativos na RIFI.

4.2.2. Western blotting

Os ensaios foram realizados empregando as ESAs e o antígeno bruto de taquizoítos (Figura 17). Os antígenos foram transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com os três grupos de soros. O antígeno bruto de taquizoítos foi igualmente reativo com soros de indivíduos soropositivos (B) e com os de toxoplasmose cerebral (C). Por outro lado, as ESAs foram altamente reativas com os soros de pacientes com toxoplasmose cerebral (canaleta F) e fracamente reativas com os soros dos indivíduos soropositivos (canaleta E). Estes dados mostram que as ESAs reagem especificamente com anticorpos produzidos durante a infecção ativa.

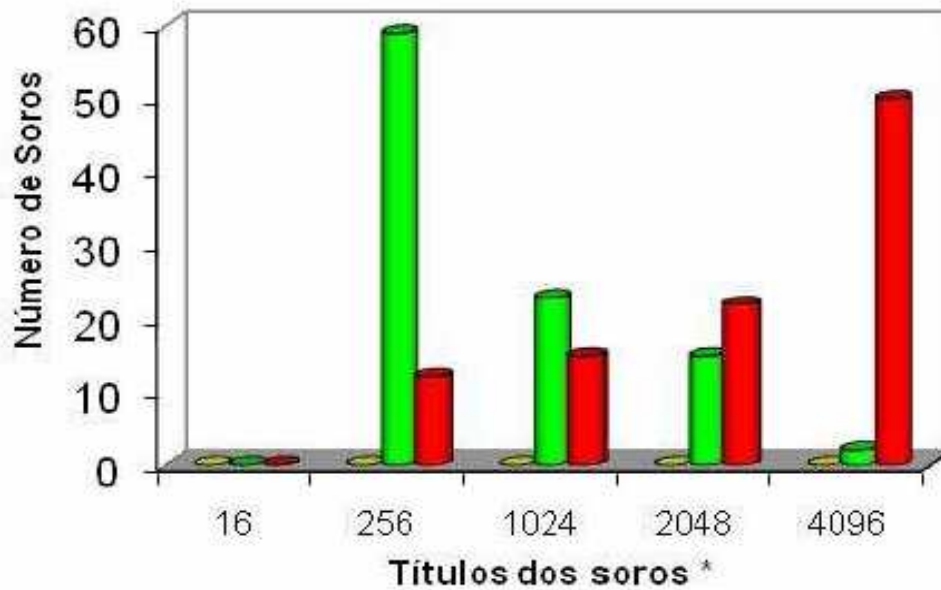


Figura 16. RIFI: distribuição dos títulos dos soros. Grupo I, 106 soros com toxoplasmose cerebral (vermelho), Grupo II, 99 soros soropositivos (verde) e Grupo III, 95 soros negativos (amarelo). *Cada título corresponde ao inverso da diluição.

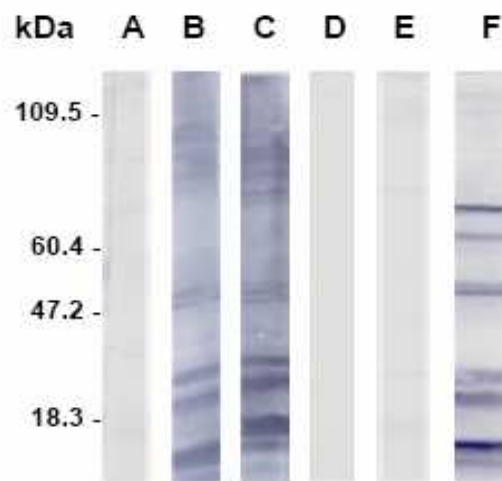


Figura 17. Western blotting: reatividade dos soros frente ao lisado bruto de taquizoítos (A, B e C) e as ESAs (D, E e F). Soro negativo (A e D), positivo para toxoplasmose (B e E) e com toxoplasmose cerebral (C e F).

4.2.3. ESA-ELISA

As reações foram realizadas em placas de baixa afinidade sensibilizadas com 1µg/ml do antígeno bruto de taquizoítos, ou na diluição de 1:40 para as ESAs. Os soros negativos obtiveram valores relativos (VR) abaixo do cut-off (média de 0.5) em ambos os antígenos (Figuras 18 e 19). Os soros de pacientes com toxoplasmose cerebral obtiveram uma média do VR de 8.7 (\pm DP 0.29) para o antígeno bruto de taquizoítos, valor similar aos dos soros dos indivíduos soropositivos que apresentou média de 8.2 (\pm DP 0.26) (Figura 18). A análise estatística pelo teste “*T de Student*” (unicaudal com variâncias iguais) demonstrou que ambos os grupos são estatisticamente similares (“*p*” não significativo).

Com a substituição do antígeno bruto pelas ESAs, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os Grupos I e II. Os soros dos pacientes com toxoplasmose cerebral apresentaram média do VR de 12.6 (\pm DP 0.74), ao passo que, os soros de indivíduos soropositivos tiveram média de 4.2 (\pm DP 0.21). A análise estatística pelo teste “*T de Student*” (unicaudal com variâncias diferentes) demonstrou que o grupo dos soropositivos apresentou média significativamente menor em relação aos dos com toxoplasmose cerebral ($p < 0,05$) (Figura 19). Adicionalmente, as médias obtidas em ambos os Grupos na ESA-ELISA e ELISA-lisado apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Estes resultados mostram que, o antígeno bruto de taquizoítos utilizado nos testes sorológicos convencionais apresentou reatividade similar em ambos os grupos de soros e não foi capaz de distinguir a doença ativa da assintomática. Por outro lado, as ESAs foram capazes de diferenciar ambos os grupos de soros, constituindo assim, um importante marcador sorológico no diagnóstico diferencial da toxoplasmose.

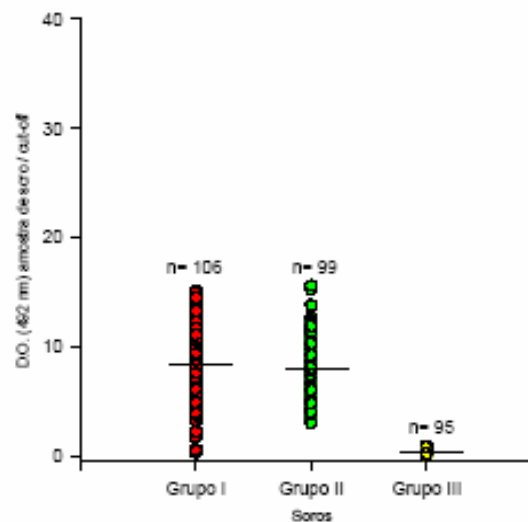


Figura 18. ELISA - antígeno bruto: reatividade dos soros. As placas sensibilizadas com antígeno bruto de taquizoítos foram incubadas com os soros com toxoplasmose cerebral - Grupo I (vermelho), soros soropositivos – Grupo II (verde) e soros negativos – Grupo III (amarelo) na diluição 1:200. Cada ponto representa o quociente entre a absorvância da amostra e a absorvância do cut-off. As linhas horizontais representam as médias aritméticas de cada grupo. A análise estatística pelo teste “*T de Student*” demonstrou que ambos os grupos são similares (“*p*” não significativo).

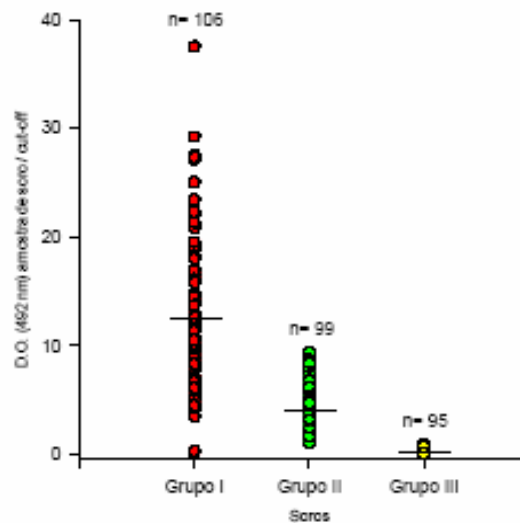


Figura 19. ESA-ELISA: reatividade dos soros. As placas sensibilizadas com as ESAs foram incubadas com os soros com toxoplasmose cerebral - Grupo I (vermelho), soros soropositivos – Grupo II (verde) e soros negativos – Grupo III (amarelo) na diluição 1:200. Cada ponto representa o quociente entre a absorvância da amostra e a absorvância do cut-off. As linhas horizontais representam as médias aritméticas de cada grupo. A análise estatística pelo teste “*T de Student*” demonstrou que ambos os grupos (I e II) são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

4.2.4. ESA: Reatividade das frações protéicas

A reatividade de cada fração protéica frente aos grupos de soros também foi analisada. Os 100 soros do grupo I foram subdivididos conforme os resultados da ESA-ELISA: 43 soros com VR similares aos dos soros do grupo II (<10); 57 soros com VR igual ou acima de 10 (≥ 10). As frações protéicas de baixo peso molecular foram igualmente reativas em ambos os grupos, porém com diferenças quanto à intensidade das bandas. A fração protéica de 15 kDa foi reativa em 100, 98 e 94% das amostras do grupo I (VR ≥ 10 e <10) e grupo II respectivamente. As frações de alto peso molecular foram mais reativas nos soros do grupo I tanto em intensidade de cor quanto a freqüência. As frações protéicas de 51, 65 e 78 kDa foram igualmente reativas dos soros do grupo I com VR ≥ 10 (96, 89 e 95%) e com VR <10 (84, 79 e 77%). Já, no grupo II a reatividade esteve presente em 49, 23 e 44% dos soros respectivamente. A fração protéica de 104 kDa foi reativa em 100% dos soros do grupo I com VR ≥ 10 , 88% dos soros com VR <10 e 22% dos soros do grupo II. As reatividades de cada fração protéica estão especificadas em detalhes na Tabela 1. Na maioria dos soros do grupo II a reatividade, quando presente, foi fraca e difícil de ser observada, se tornando imperceptível pouco tempo depois da realização do teste.

Contraditoriamente, nos soros do grupo I a reatividade de bandas foi intensa e duradoura.

Tabela 1. Western blotting: Reatividade das frações protéicas nos soros dos grupos I e II.

ESA-ELISA	Western blotting soros reagentes: n^1 (%)							
	Proteínas reativas (kDA)							
	10	15	22	32	51	65	78	104
Grupo I: $VR^2 \geq 10$ (57)	55 (96)	57 (100)	44 (72)	46 (81)	55 (96)	51 (89)	54 (95)	57 (100)
Grupo I: $VR < 10$ (43)	37 (86)	42 (98)	28 (65)	32 (74)	36 (84)	34 (79)	33 (77)	38 (88)
Grupo II (99)	80 (81)	93 (94)	46 (46)	58 (59)	49 (49)	23 (23)	44 (44)	22 (22)

1. número de soros; 2. valor relativo

5. DISCUSSÃO

A invasão da célula hospedeira é uma etapa fundamental na infecção por *Toxoplasma gondii*. Tal mecanismo não se efetivaria sem a participação das três organelas secretórias, presentes no complexo apical do parasita (micronemas, roptrias e grânulos densos), que liberam proteínas essenciais no processo de penetração celular e estimulação do sistema imune hospedeiro (Prigionne et al., 2000; Carruthers e Blackman, 2005). As ESAs proporcionam importantes interações na relação parasita-hospedeiro (Reiss et al., 2001; Sinai e Joiner, 2001). Dentre a totalidade de antígenos produzidos pelo parasita, as ESAs se destacam por serem altamente imunogênicas tanto na infecção natural como na experimental e, na capacidade em induzir resposta imune protetora (Hughes e Van-Knapen, 1982; Cesbron-Delauw e Capron, 1993; Fischer et al., 1998; Yamamoto et al., 1998; Dlugonska et al., 2001; Almeida Ribeiro et al., 2002). Tais características fazem com que sejam importantes marcadores sorológicos no diagnóstico da toxoplasmose. Neste trabalho, avaliamos o seu emprego como antígeno em reações sorológicas como a ELISA e western blotting, na tentativa de oferecer um diagnóstico diferencial da toxoplasmose ativa, auxiliando no diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids.

A primeira parte do presente trabalho consistiu em aperfeiçoar a recuperação das ESAs. Para tanto, alguns parâmetros foram avaliados. Atualmente, diferentes protocolos estão disponíveis. A maioria dos estudos recuperam as ESAs incubando-se taquizoítos da cepa RH retirados de camundongos infectados em meio de cultura a 37°C por tempos variáveis (45 minutos a 4 horas) (Nockemann et al., 1998; Prigione et al., 2000; Ribeiro et al., 2002; Borges, 2005). Alternativamente, os parasitas são estimulados a liberar proteínas dos micronemas na presença de etanol 1% que eleva os níveis de cálcio intracelular (Carruthers et al., 2000; Zhou et al., 2005). Aqui, as ESAs foram recuperadas dos sobrenadantes de culturas celulares (Hafid et al., 1992) 48 horas pós-infecção, onde obteve-se maior concentração protéica, tempos superiores a 48 horas, além de ocorrer

desnaturação das proteínas dissolvidas no sobrenadante, inicia-se a destruição da monocamada de células VERO. O tempo máximo de armazenamento desse antígeno deve ser por um período máximo de quatro meses a -20°C , temperatura sugerida pela maioria dos trabalhos (Nockemann et al., 1998; Carruthers et al., 2000; Ribeiro et al., 2002; Zhou et al., 2005). Passado este período, algumas proteínas desnaturam acabando por comprometer sua capacidade antigênica.

A possível interferência dos inibidores de proteases na reação e na recuperação das ESAs também foi avaliada. Sua utilização é importante, pois no processo de invasão celular, as proteases liberadas pelo parasita desempenham distintos papéis no transporte e regulação de proteínas invasoras (Carruthers e Blackman, 2005; Carruthers, 2006). Nossos resultados mostraram que, não houve diferença no padrão de bandas em amostras analisadas com ou sem inibidores de proteases. Contudo, ressaltamos a importância da adição de inibidores para que o antígeno mantenha-se estável por mais tempo. Outros autores também concordam com estes achados (Nockemann et al., 1998; Prigione et al., 2000; Ribeiro et al., 2002; Assossou et al., 2004; Borges, 2005).

Outro parâmetro avaliado foi a desnaturação pelo aquecimento. Sabe-se que no procedimento de preparo da amostra para SDS-PAGE, a adição do tampão da amostra seguido pela desnaturação pela fervura (100° por 3 minutos) promove a quebra de interações macromoleculares incluindo todas as interações não-covalentes e pontes dissulfeto e previne modificações nas proteínas mantendo-as em solução durante o SDS-PAGE. Amostras de ESAs e do antígeno bruto de taquizoítos desnaturados pela fervura apresentaram bandas mais visíveis e uniformes após coloração por Coomassie Azul Brilhante quando comparadas às não desnaturadas. Este dado evidenciou a importância da desnaturação das proteínas no momento de sua análise por SDS-PAGE.

A padronização da ELISA e western blotting utilizando as ESAs foi fundamental para este estudo. Em um teste sorológico confiável e de qualidade, além de um bom antígeno, vários princípios imunológicos devem

ser considerados. Na ELISA, a fase sólida é um fundamento criterioso, uma vez que o antígeno deve ser uniformemente adsorvido nas placas para a realização do ensaio. Ligações ineficientes do antígeno à placa diminuem a sensibilidade do teste assim como as desiguais afetam a sua reprodutibilidade e confiabilidade (Venkatesan e Wakelin, 1993). Resultados mais confiáveis foram obtidos na ESA-ELISA quando o antígeno foi sensibilizado em placas de baixa afinidade. O emprego das placas de alta afinidade resultou em uma alta reatividade nos soros controles, o que poderia favorecer o aparecimento de falsos positivos nos demais ensaios.

A otimização do procedimento de sensibilização das placas, conhecido como “coating” visa identificar a melhor concentração do antígeno e seu pH ideal (Shekarchi et al., 1982, 1984). Isto é feito usando titulações do antígeno em tampões com diferentes pHs. Quando as ESAs foram diluídas em tampão com pH 7.2 a 8.5 apresentaram bons resultados. Desta forma, os efeitos de diferentes pHs devem ser investigados e comparados logo no início do ensaio em desenvolvimento.

Um dos grandes interferentes em nossos ensaios decorrentes da recuperação das ESAs foi a presença de albumina bovina. Na tentativa de eliminar os restos de SFB, realizamos sucessivas lavagens das garrafas de células com meio de cultura sem SFB antes da infecção. No entanto, não conseguimos eliminá-lo por completo e conseqüentemente, as concentrações protéicas não foram determinadas nos lotes de antígeno. Desta forma, optamos por diluições seriadas a fim de determinar a concentração do antígeno a ser utilizada na sensibilização das placas. Através de diluições seriadas determinamos também os títulos dos soros e conjugados que seriam utilizados nos ensaios. Os soros foram testados nas diluições de 1:200 e 1:50 e o conjugado 1:10000 e 1:500 na ELISA e western blotting respectivamente. Neste último, também foi definido a concentração do antígeno a ser transferida para as membranas de nitrocelulose. Quantidades inferiores a 19 µg não foram capazes de serem observadas na membrana de nitrocelulose após a transferência das proteínas.

A segunda parte deste estudo foi direcionada para o diagnóstico dos grupos de soros estudados. Vários testes estão disponíveis para o diagnóstico da toxoplasmose, mas o principal enfoque é determinar a infecção recente principalmente em gestantes e estabelecer o diagnóstico em pacientes imunocomprometidos. Pacientes com toxoplasmose sintomática podem apresentar quadros muitas vezes fatais (Liesenfeld et al., 1999). Um diagnóstico rápido e preciso é de vital importância para o rápido início do tratamento evitando-se seqüelas, assim como o aumento da sobrevivência dos pacientes, principalmente os imunocomprometidos como aqueles com aids. Para os programas de saúde, tais medidas evitam gastos com os altos índices de morbidade de indivíduos em idade produtiva. O diagnóstico da toxoplasmose cerebral na prática clínica consiste na presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro, achados clínicos e radiológicos, associados a uma adequada resposta terapêutica, entre o 10º e 14º dia de tratamento anti-*T. gondii* (American Academy of Neurology, 1998). Neste contexto foi avaliado o emprego das ESAs como ferramenta para compor o diagnóstico da toxoplasmose cerebral, tornando-o mais rápido e menos invasivo. Em países de elevada prevalência de toxoplasmose, como o Brasil, a maioria da população apresenta anticorpos IgG anti-*T. gondii* refletindo infecção crônica. Neste contexto, a sorologia convencional apresenta limitações. Uma sorologia positiva não é indicador de doença ativa, o que faz da sorologia quantitativa e de novos métodos sorológicos como os baseados nas proteínas ESAs de *T. gondii* um recurso diagnóstico a ser considerado nestes pacientes.

Várias técnicas foram desenvolvidas para a obtenção de antígenos para o uso no sorodiagnóstico. Dentre os mais empregados estão aqueles obtidos a partir da lise de taquizoítos por hidrólise (Jacobs e Lunde, 1957; Singh et al., 1978), por congelamento e descongelamento (Pettersen, 1968; Pokorny et al., 1972; Carlier et al., 1980) e por ultrassom (Voller et al., 1976). Frente à diversidade de extratos antigênicos passíveis de obtenção, a cinética de detecção de anticorpos específicos tem sido enfoque de estudos que objetivam determinar marcadores para a toxoplasmose. Os extratos

antigênicos de *T. gondii* requerem produção em massa do parasita extraída a partir de fluídos peritoneais de camundongos infectados ou a partir de cultura de células. Outros estudos avaliam o uso de antígenos recombinantes, dentre eles destacam-se as proteínas recombinantes provenientes dos grânulos densos como as GRA1-p24, GRA2-p28, GRA4-p41, GRA6-p32, GRA7-p29 e GRA8-p35 (Cesbron-Delauw et al., 1989; Prince et al., 1989; Knapp et al., 1991; Mevelec et al., 1992; Jacobs et al., 1998; Redlich e Müller, 1998; Aubert et al., 2000; Li et al., 2000b; Suzuki et al., 2000; Beghetto et al., 2003); de superfície como as SAG1-p30 e SAG2-p22 (Burg et al., 1988; Parmley et al., 1992; Harning et al., 1996; Aubert et al., 2000; Beghetto et al., 2003); das roptrias como as ROP1-p66 e ROP2-p54 (Knapp et al., 1991; Van Gelder et al., 1993; Aubert et al., 2000); e dos micronemas como as MIC3-p90 e MIC5-p22 (Beghetto et al., 2003). Em geral, a reatividade destes antígenos recombinantes tem sido avaliada por ELISA na forma única ou em coquetéis (Aubert et al., 2000; Li et al., 2000a; Pietkiewicz et al., 2004). A vantagem do uso de antígenos recombinantes deve-se ao conhecimento preciso da composição da molécula e a possibilidade do uso de mais de uma proteína recombinante numa única reação. Porém, desvantagens também foram observadas, como a possibilidade de uma proteína recombinante mudar sua configuração espacial, o que poderia não ser reconhecida pelo anticorpo como a produzida por *T. gondii* (Pietkiewicz et al., 2007), diminuindo, então, a sensibilidade do antígeno numa reação sorológica. A importância deste processo é enfatizada por Huang et al. (2002) e por Pietkiewicz et al. (2007), ressaltando que os anticorpos produzidos contra antígenos nativos podem não reconhecer ou não ligar a um dado antígeno recombinante com a mesma afinidade. Aqui, optamos pelo uso de um “pool” das proteínas liberadas por taquizoítos durante a sua penetração na célula hospedeira durante 48 horas. Há poucos trabalhos evidenciando a reatividade dessas proteínas em conjunto, pois conforme mencionado, a maioria dos estudos que analisam o seu potencial antigênico refere-se a proteínas recombinantes.

Ao utilizarmos para efeito de comparação, o antígeno constituído de lisado bruto de taquizoítos verificamos que o mesmo não foi capaz de distinguir a doença ativa da assintomática, pois sua reatividade foi similar em ambos os grupos (I e II), tanto na ELISA quanto no western blotting. Este antígeno, comumente utilizado no diagnóstico da toxoplasmose, consiste na combinação de antígenos do parasita, como os citoplasmáticos e de membrana, os quais exibem múltiplos epítomos que se ligam a inúmeros anticorpos. Devido a tais características, acreditamos que tanto pacientes sintomáticos como indivíduos assintomáticos apresentaram similar reatividade. Por outro lado, os antígenos excretados/secretados por taquizoítos foram altamente antigênicos quando ensaiados com soros de indivíduos com infecção ativa. Como estes pacientes são imunocomprometidos, a perda progressiva da imunidade celular causa a reativação da infecção latente (Luft e Remington, 1992). Neste caso, a encefalite focal causada por *T. gondii* resulta da conversão do estágio de bradizoíto encerrado em cistos teciduais para o estágio ativo e replicante de taquizoíto (Liesenfeld et al., 1999; Contini et al., 2002; Smith et al., 2006). Com grande quantidade de parasitas ocorre alta produção de ESAs e, conseqüentemente, há uma intensa produção de anticorpos anti-ESAs. Em concordância, os soros de indivíduos assintomáticos cuja infecção encontra-se em fase crônica, com bradizoítos encistados e ausência de taquizoítos circulantes apresentaram pouca reatividade tanto em ESA-ELISA como em western blotting.

Quando os resultados da ESA-ELISA foram comparados com os da RIFI, observou-se que, parcela considerável dos soros de pacientes com toxoplasmose cerebral (48,1%) apresentou títulos altos na RIFI (4096) e na ESA-ELISA. Por outro lado, 59% dos soros de indivíduos soropositivos apresentaram títulos baixos (256), em ambos os testes. Estes resultados sugerem que pacientes com toxoplasmose cerebral desenvolvem altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, conforme resultados obtidos em estudos anteriores (Derouin et al., 1996; Hellerbrand et al., 1996; Colombo et al. 2005). No entanto, como a maioria dos pacientes com toxoplasmose

cerebral tem imunodepressão grave, alguns deles produzem quantidades mínimas de anticorpos. Neste estudo, seis pacientes (5,6%) com PCR positiva apresentaram sorologia negativa (RIFI e ELISA) em concordância, a maioria dos estudos registra baixos índices sorológicos não reagentes em pacientes com aids (< 6%) (Skiest, 2002; Collazos, 2003; Vidal et al., 2005).

A comparação dos resultados da ESA-ELISA com os obtidos pela RIFI corrobora com os achados de outro estudo realizado em paralelo em nosso laboratório. Costa-Silva (2008) mostrou que anticorpos anti-ESAs produzidos em camundongos por imunizações reconhecem na RIFI o parasita íntegro, pois apesar da maior parte das ESAs serem liberadas pela porção apical, grande parte também é liberada nas regiões laterais do protozoário (secreção dos grânulos densos) (Soldati e Meissner, 2004; Souza, 2006).

As análises feitas nos resultados gerados por western blotting mostraram que os soros dos pacientes com toxoplasmose cerebral foram mais reativos contra as ESAs do que os indivíduos soropositivos. Quando a reatividade dos soros do grupo II foi presente, a intensidade das bandas foi fraca, praticamente imperceptível pela pouca quantidade de anticorpos. Contraditoriamente, os soros do grupo I apresentaram alta reatividade. Contudo, a reatividade das diferentes frações protéicas também variou entre os grupos estudados. As proteínas de baixo peso molecular foram freqüentes em ambos os grupos. Evidenciamos que a fração protéica de 15 kDa foi reativa nos soros dos grupos I (98-100%) e II (94%). No entanto, as proteínas de alto peso molecular apresentaram diferenças entre os grupos. Destacamos a fração protéica de 104 kDa que foi reativa em 88-100% nos soros do grupo I e somente em 22% dos soros do grupo II. Estes resultados sugerem que dentre as ESAs, as proteínas de alto peso molecular podem ser bons marcadores para a identificação da toxoplasmose sintomática.

Também através do Imunoblot, Raffi et al. (1999) utilizando o extrato de taquizoítos analisou um total de 186 soros de pacientes HIV positivos, divididos em dois grupos, e evidenciaram que as bandas de 27 e 32kDa foram preditoras da toxoplasmose cerebral. Dos 113 soros com a

doença, 45% reagiram com uma proteína de 27kDa e 73% com uma de 32kDa. Já dos 73 pacientes sem a doença, 20% reagiram com a de 27kDa e 49% com a de 32kDa. No entanto, o estudo ressalta que o grande número de componentes antigênicos nesta região de 20 a 35kDa faz difícil a correlação destes achados, sugerindo que o teste poderia ser usado em complementariedade com os achados clínicos e por imagem.

Nos últimos anos, os métodos moleculares representaram um importante avanço no diagnóstico da toxoplasmose em pacientes com aids. Porém, esses métodos ainda são restritos a centros de referência e geralmente inacessíveis para a grande maioria dos hospitais de países em desenvolvimento. A utilização do diagnóstico sorológico, apesar dos resultados contraditórios, parece ser um recurso a ser considerado em pacientes com suspeita ou risco de toxoplasmose cerebral. Este estudo destaca a utilização das ESAs de *T. gondii* no imunodiagnóstico como um importante marcador sorológico do diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids.

6. CONCLUSÕES

- a- Padronizamos a recuperação das ESAs para emprego na ELISA e western blotting através da análise de alguns parâmetros como tempo de obtenção, armazenamento e processamento do antígeno.
- b- Foi possível determinar a diferenciação dos pacientes com toxoplasmose cerebral daqueles com toxoplasmose crônica por ELISA e western blotting utilizando-se as ESAs como antígeno.
- c- Dentre as ESAs, as frações protéicas de alto peso molecular foram as responsáveis pela diferenciação de ambos grupos de soros, mostrando que são bons marcadores de doença ativa.
- d- O antígeno bruto de taquizoítos utilizado na sorologia convencional não distinguiu soros de pacientes com toxoplasmose cerebral dos indivíduos crônicos, tanto por ELISA quanto por western blotting.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarons E, Hawkins D, Nelson M, Gazzard B. Testing and management of *Toxoplasma* serology in HIV-seropositive patients. AIDS 1996; 10: 443-444.

Abgrall S, Rabaud C, Costagliola D, the Clinical Epidemiology Group of the French Hospital Database on HIV. Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2001; 53: 1747-1755.

Adjogble KDZ, Mercier C, Dubremetz JF, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-Delaw MF, et al. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. Int J Parasitol 2004; 34: 1255-1264.

Allain JP, Palmer CR, Pearson G. Epidemiological study of latent and recent infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women from a regional population in the UK. J Infect 1998; 36: 189-196.

Almeida Ribeiro AD, Souza MA, Mineo LR. Detection of antibodies to the 97 kDa component of *Toxoplasma gondii* in samples of human serum. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2002; 97: 1008-1013.

Alonso R, Martinez E, Laynez P, Miguelez M, Piñero JE, Valladares B. Detección mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada de *Toxoplasma gondii* en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Med Clin 2002; 118: 294-296.

Amato Neto V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS. Toxoplasmose. 4.ed. São Paulo: Sarvier; 1995. p.154.

Amendoeira MRR, Da Costa T, Spalding SM. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. Revista Souza Marques 1999; 1: 15-35.

American Academy of Neurology. Evaluation and management of intracranial mass lesions in AIDS. Report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 1998; 50: 21-26.

Ammassari A, Scoppettuolo G, Murri R, Pezzotti P, Cingolani A, Del Borgo C, et al. Changing disease pattern in focal brain lesion-causing disorders in AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18: 365-371.

Ammassari A, Cingolani A, Pezzotti P, De Luca A, Murri R, Giancola ML, et al. AIDS-related focal brain lesions in the era of highly active antiretroviral therapy. *Neurology* 2000; 55: 1194-1200.

Antinori A, Ammassari A, De Luca A, Cingolani A, Murri R, Scoppettuolo G, et al. Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: A decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. *Neurology* 1997; 48: 687-694.

Antinori S, Ridolfo AL, Gianelli E, Piazza M, Gervasoni C, Monforte AA. The role of lumbar puncture in the management of elevated intracranial pressure in patients with AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1309-1311.

Antinori A, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, et al. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. *HIV/AIDS* 2004; 39: 1681-1691.

Asai T, O'Sullivan WJ, Tatibana MA. A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 1983; 258: 6816-6822.

Ashburn D, Joss AWL, Pennington TN, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of *Toxoplasma* infection in pregnancy? *J Clin Pathol* 1998; 4: 312-315.

Assossou O, Besson F, Rouault JP, Persat F, Ferrandiz J, Mayençon M, et al. Characterization of an excreted/secreted antigen form of 14-3-3 protein in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Fems Microbiol Let* 2004; 234: 19-25.

Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1144-1150.

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infect Dis* 2003; 9: 55-62.

Baldi DL, Andrews KT, Waller RF, Roos DS, Howard RF, Crabb BS, et al. RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Embo J* 2000; 19: 2435-2443.

Beaman MH, Luft BJ, Remington JS. Prophylaxis for toxoplasmosis in AIDS. *Ann Intern Med* 1992; 117: 163-164.

Beaman MH, McCabe RE, Wong SY, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Bennett JE e Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol. 2, 4 ed., Churchill Livingstone; 1995. p. 2455-2475.

Beckers CJM, Wakewfield T, Joiner KA. The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neosporium caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 89: 209-223.

Beghetto E, Spadoni A, Buffolano W, Del Pezzo M, Minenkova O, Pavoni E, et al. Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries. *Int J Parasitol* 2003; 33: 163-173.

Bessières MHO, Le Breton SO, Séguéla JP. Analysis by immunoblotting of *Toxoplasma gondii* exo-antigens and comparison with somatic antigens. Parasitol Res 1992; 78: 222-228.

Bishburg E, Eng RH, Slim J, Perez G, Johnson E. Brain lesions in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Intern Med 1989; 149: 941-943.

Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. Mol Biochem Parasitol 2001; 117: 11-25.

Bohne W, Heesemann J, Gross U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon treated mouse macrophages. Infect Immun 1993; 61: 1141-1145.

Bohne W, Gross U, Ferguson DJP, Heesemann J. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to small heat-shock proteins of plants. Mol Microbiol 1995; 16: 1221-1230.

Borges AS, Figueiredo JFC. Evaluation of intrathecal synthesis of specific IgG antibodies against *Toxoplasma gondii* in the diagnosis assessment of presumptive toxoplasma encephalitis in AIDS patients. Rev Soc Bras Med Trop 2004a; 6: 480-484.

Borges AS, Figueiredo JFC. Detecção de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* no soro, líquido e saliva de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e neurotoxoplasmose. Arq Neurop 2004b; 4: 1033-1037.

Borges FAC. Caracterização de antígenos metabólicos de formas taquizoítas de *T. gondii* e sua aplicação no diagnóstico sorológico da toxoplasmose humana. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.

Bou G, Figueroa MS, Marti-Belda P, Navas E, Guerrero A. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. J Clin Microbiol 1999; 37: 3465-3468.

Brecht S, Carruthers VB, Ferguson DJP, Giddings OK, Wang G, Jakle V, et al. The *Toxoplasma* micronemial protein MIC4 is an adhesion composed of six conserved apple domains. J Biol Chem 2001; 276: 4119-4127.

Brooks RG, McCabe RE, Remington JS. Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. Rev Infect Dis 1987; 9: 1055-1062.

Brydges SD, Sherman GD, Nockemann S, Loyens A, Daubener W, Dubremetz JF, et al. Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol 2000; 111: 51-56.

Bulow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes J Immunol 1991; 147: 3496-3500.

Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J Immunol 1988; 141:3584–3591.

Bushrod F. Toxoplasmosis: not just a risk during pregnancy. Clin Lab Int 2004; 28: 4.

Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. Parasitology 1995; 110: S11-S16.

Camargo ME, Leser PG. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II- Evolutive study of antibodies and serological

patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1976; 4: 227-238.

Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. Infect Immun 1978; 1: 55-58.

Camargo ME. Toxoplasmosis. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p.165-174.

Camargo B. Ação do *Toxoplasma gondii* em animais será mapeada. Agência USP de notícias [serial on line] 2003 [citado em Junho 2003] disponível: URL: <http://www.usp.br/agenciausp>.

Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. Ver Ass méd Brasil 2000; 4: 335-41.

Capron A, Dessaint JP. Vaccination against parasitic diseases; some alternative concepts for the definition of protective antigens. Ann Inst Pasteur Immunol 1988; 139: 109-117.

Carey KL, Donahue CG, Ward GW. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol 2000; 97: 109-121.

Carlier Y, Bout D, Dessaint JP, Capron A, Knapen FV, Ruttenberg EG, et al. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis. Bull WHO 1980; 58: 99.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential proteins secretion from three distinct organelle of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblast. Eur J Cell Biol 1997; 73: 114-123.

Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates micronema discharge in *Toxoplasma gondii*. Mol Microbiol 1999; 31: 421-428.

Carruthers VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. Parasitol Int 1999; 48: 1-10.

Carruthers VB, Sherman GD, Sibley LD. The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. J Biol Chem 2000; 275: 14346-14353.

Carruthers VB, Blackman MJ. A new release on life: emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. Mol Microbiol 2005; 6: 1617-1630.

Carruthers VB. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. Int J Parasitol 2006; 36: 595-600.

Centers for Disease Control and Prevention. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. JAMA 1993; 269: 729-730.

Cesbron-Delauw MF, Guy B, Torpier G, Pierce RJ, Lenzen G, Cesbron JY, et al. Molecular characterization of a 23-kilodalton K major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 7537-7541.

Cesbron-Delauw MF, Capron A. Excreted / secreted antigens of *Toxoplasma gondii* their origin and role in the host – parasite interaction. Res Immunol 1993; 144: 41-44.

Cesbron-Delauw MF. Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host parasite relationship. *Parasitol Today* 1994; 10: 293-296.

Cimino C, Lipton RB, Williams A, Fcraru E, Harris C, Hirschfeld A. The evaluation of patients with human immunodeficiency virus-related disorders and brain mass lesions. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1381-1384.

Cingolani A, De Luca A, Ammassari A, Murri R, Linzalone A, Grillo R, et al. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. *J Med Microbiol* 1996; 45: 472-476.

Cingolani A, De Luca A, Larocca LM, Ammassari A, Scerrati M, Antinori A, et al. Minimally invasive diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 364-369.

Cinque P, Vago L, Dahl H, Brytting M, Terreni MR, Fornara C, et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. *AIDS* 1996; 10: 951-958.

Cleary MD, Singh U, Blader IJ, Brewer JL, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of genes expression. *Eukaryot Cell* 2002; 1: 329-340.

Cohen BA. Neurological manifestations of toxoplasmosis in AIDS. *Sem Neurol* 1999; 19: 201-211.

Collazos J. Opportunistic infections of the CNS in patients with AIDS. *CNS Drugs* 2003; 17: 869-887.

Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernández AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS

patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5044-5047.

Contini C, Cultrera R, Seraceni S, Segala D, Romani R, Fainard E, et al. The role of stage-specific oligonucleotide primers in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated *Toxoplasma gondii* encephalitis in patients with AIDS. *Diag Microbiol* 2002; 51: 879-890.

Contreras MD, Sandoval ML, Salinas P, Muñoz P, Vargas S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y cronica. *BolChil Parasitol* 2000; 55: 1-10.

Coutinho SG, Vergara TRC. Toxoplasmosse. In: Coura JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 815-829.

Costa-Silva TA. Análise do potencial antigênico de proteínas excretadas por taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. [dissertação]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz-SP; 2008.

Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 32-36.

Danneman BR, McCutchan JA, Israelski DM, et al. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS: a randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfonamides. *Ann Intern Med* 1992; 116: 33-43.

Darcy F, Foudrinier F, Michelet C, et al. Diagnostic value of specific IgA antibodies in AIDS patients with *Toxoplasma* infection: a bicentric evaluation. *Immunol Lett* 1991; 30: 345-348.

Darcy F, Santoro F. In: Parasitic Infections and de Immune System, (Kierszerbaum, F. Ed.) New York: Academic Press Inc; 1994. p.163 – 201.

Decoster A, Darcy F, Capron A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. Clin Exp Immunol 1988; 73: 376-382.

Derouin F, Thulliez P, Garin YJ. Value and limitations of toxoplasmosis serology in HIV patients. Pathol Biol 1991; 39: 255-259.

Derouin F, Leport C, Pueyo S, Morlat P, Letrillart B, Chene G, et al. Predictive value of *Toxoplasma gondii* antibody titres on the occurrence of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. AIDS 1996; 10: 1521-1527.

Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. N Engl J Med 1974; 290: 1110-1116.

Dlugonska H, Dytynska K, Golinska D, Kurnatowska A. Serodiagnostics of *Toxoplasma gondii* invasions. Wiad Parazytol 2001; 1: 39-44.

Donahue CG, Carruthers VB, Gilk SD, Ward GE. The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. Mol Biochem Parasitol 2000; 111: 15-30.

Duarte MIS, Andrade JR HF. Toxoplasmose. In: Brasileiro Fo G, Pitella JEH, Pereira FEL., Bambirra EA, Barbosa AIA (eds). Bogliolo Patologia. 5º ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. p.1161-1168.

Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Press 1988; 41-60.

Dubey JP. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier JP (ed). Parasitic Protozoa. Vol VI, New York: Academic Press; 1993. p.1-57.

Dubey JP. *Toxoplasma gondii*. In S. Baron, R.C. Peake, D.A. James, M.Susman, C.A. Kennedy, M.J.D. Singleton, and S.Schuenke (ed.), Medical Microbiology, 5th ed. The University of Texas. 1996; [Online.] www.ncbi.nlm.nih.gov/books

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 1998; 7: 1019-1024.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and development of Tissue Cyst. Clin Microbiol Rev 1998; 2: 267-299.

Dubremetz JF, Achbarou A, Bermudes D. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii* host-cell interaction. Parasitol Res 1993; 79: 401-408.

Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. J Clin Microbiol 1995; 33: 2421-2426.

Dupouy-Camet J, De Souza SL, Maslo C, Paugam A, Saimot AG, Benarous R, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 1966-1969.

Eggers C, Grob U, Klinker H, Schalke B, Stellbrink HJ, Kunze K. Limited value of cerebrospinal fluid for direct detection of *Toxoplasma gondii* in toxoplasmic encephalitis with AIDS. J Neurol 1995; 242: 644-649.

Ferrandiz J, Mercier C, Wallon M, Picot S, Cesbron-Delauw MF, Peyron F. Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granules antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 1016-1021.

Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 159-162.

Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, Blackstad M, Sorensen SW. Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 2327-2331.

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

Fischer HG, Stachelhaus S, Sahm M, Meyer HE, Reichmann. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. Mol Biochem Parasitol 1998; 91: 251-262.

Forestier F. Les foetopathies infectieuses: prevention, diagnostic prenatal, attitude pratique. Press Med 1991; 20: 1448-1454.

Franzen C, Altfeld M, Hegener P, Hartmann P, Arendt G, Jablonowski H, et al. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol 1997; 35: 2639-2641.

Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. Bio Science 1973; 23: 343-352.

Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa M, Yamada Y, Wada H, et al. L-Tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: Cross-

regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 2002; 70: 779-786.

Galisteo Jr AJ. *Toxoplasma gondii* VS radiação ionizante: Estudo da imunidade intestinal em camundongos C57Bl/6j experimentalmente vacinados com taquizoítos irradiados. [dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo; 2004.

Garcia JS, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC, Garcia SMF et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela tela de Amsler em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. *Ver Bras Med Trop* 1999; 32: 671-676.

Garweg JG, Jacquier P, Boehnke M. Early aqueous humor analysis in patients with human ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 996-1001.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Deukers EY, Hienry S, Caspar-Trinchieri G et al. Parasite – induced IL-12 stimulates early INF- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994; 153: 2533-2543.

Gianotti N, Cinque P, Castagna A, Novati R, Moro M, Lazzarin A. Diagnosis of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. *AIDS* 1997; 11: 1529-1530.

Gilbert RE, Peckham CS. Prenatal screening for *Toxoplasma* infection. In: Joyson HM, Wreghitt TG (eds.), *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p. 214-240.

Gilbert RE, Grass L, Wallon M, Peyron F, Ades AE, Dunn DT. Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1303-1308.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Jr M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 1992; 114: 136-144.

Grant IH, Gold JW, Rosenblum M, Niedzwiecki D, Armstrong D. *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS. *AIDS* 1990; 4: 519-521.

Gray F, Keohane C. The neuropathology of HIV infection in the era of highly antiretroviral therapy (HAART). *Brain Pathol* 2003; 13: 79-83

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: redistribution of tachyzoite surface protein during host cell invasion and intracellular development. *Parasitol Res* 1995; 81: 657-1.

Gross U, Bohne W, Soete M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 1996; 12:30-33.

Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2297-2301.

Guimarães ACS, Kawarabayashi M, Borges MM, Tolezano JE, Andrade Jr HF. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Rev Inst Med Trop SP* 1993; 35: 479-483.

Gutiérrez J, Maroto C. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious disease? A review. *Microbious* 1996; 87: 113-121.

Hafid J, Raberin H, Pozzetto B, Akonso ZY, Tran Manh Sung R, Jana M, et al. Comparison of excretory/secretory and circulating antigens of *Toxoplasma*

gondii by enzyme immunoassay and immunoblotting. Int J Parasitol 1992; 22: 1083-1088.

Hajeer AH, Balfour AH, Mostratos A, Crosse B. *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum. Parasite Immunol 1994; 16: 43-50.

Haverkos HW. Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. Am J Med 1987; 82: 907-914.

Harning D, Spenter J, Metsis A, Vuust J, Petersen E. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3: 355-357.

Harrison MJ, McArthur JC. Opportunistic infections – parasites. In: Harrison MJ, McArthur JC (eds.) Clinical neurology and neurosurgery monographs. AIDS and neurology. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995. p.171-181.

Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. J Infect Dis 1989; 159: 736-740.

Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME, Bradley PJ, Dubremetz JF, Ortega-Barria E, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* homologue of *Plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. Infect Immun 2000; 68: 7078-7086.

Hellerbrand C, Goebel FD, Disko R. High predictive value of *Toxoplasma gondii* IgG antibody levels in HIV-infected patients for diagnosis of cerebral toxoplasmosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 869-872.

Hill DE, Chirukandoth S., Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev 2005; 6: 41-61.

Hitt JA, Filice GA. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. J Clin Microbiol 1992; 30: 3181-3184.

Hoff EF, Cook SH, Sherman GD, Harper JM, Fergusson DJP, Dubremetz JF, et al. *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10. Exp Parasitol 2001; 2: 77-88.

Hofflin JM, Remington JS. Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood of a patient with AIDS. Arch Intern Med 1985; 145: 925-926.

Holliman RE. Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. J Infect 1988; 16: 121-128.

Holliman RE, Raymond R, Renton N, Johnson JD. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. Epidemiol Infect 1994; 112: 399-408.

Huang X, Xuan X, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* SAG2 expressed in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 1343-1347.

Hughes HPA, Van-Knapen F. Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. Int J Parasitol 1982; 12: 433-437.

Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor- β inhibits interleukin-12 induced production of interferon- γ by natural killer cells: A role for transforming growth factor- β in the regulation of T-cells independent resistance to *Toxoplasma gondii*. Eur J of Immunol 1995; 25: 994-1000.

Huskinson J, Thulliez P, Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by human immunoglobulin A antibodies. J Clin Microbiol 1990; 12: 2632-2636.

Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. Embo J 2003; 22: 2082-2090.

Jacobs L, Lunde MN. A heagglutination test for toxoplasmosis. J Parasitol 1957; 43: 308-314.

Jacobs D, Dubremetz JF, Loyens A, Bosman F, Saman E. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol 1998; 91: 237-249.

James GS, Sintchenko VG, Dickeson DJ, Gilbert GL. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. J Clin Microbiol 1996; 34: 1572-1575.

Jebbari H, Roberts CW, Ferguson DJP, Bluethmann H, Alexander J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol 1998; 20: 231-239.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of anti-toxoplasma immunoglobulin G avidity. J Clin Microbiol 1997; 35: 1972-1977.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, et al. Eng J. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. J Clin Microbiol 1998; 36: 2900-2906.

Joiner KA, Roos DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. J Cell Biol 2002; 157: 557-563.

Jones C, Bientz A, Erb P. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma infection. *Infect Immun* 1985; 51: 147-156.

Jones JL, Sehgal M, Maguire JH. Toxoplasmosis-associated deaths among immunodeficiency virus-infected persons in the United States, 1992-1998. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1161.

Joseph P, Calderon M, Gilman RH et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4499-4503.

Joynson DH, Payne RA, Rawal BK. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 1990; 43: 1032-1033.

Jung C, Lee CYF, Grigg ME, The superfamily of *Toxoplasma gondii* surface proteins. *Int J Parasitol* 2004; 34: 285-296.

Kahi S, Cozon GJN, Greenland T, Wallon M, Gay-Andrieu F, Peyron F. A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against *Toxoplasma gondii* in humans. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5: 745-748.

Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Ménard R. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol* 1999; 5: 937-944.

Kawarabayashi M, Aureliano DP, Raymundo ML, Garcia RA, Costa-Silva TA, Castellão KG, et al. Freqüência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres, atendidas nas unidades da rede de saúde pública da região metropolitana de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2007; 1: 63-67.

Kasper LH, Mineo JR. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 1994; 10: 184-188.

Kim K, Soldati D, Boothroyd JC. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* 1993; 262: 911-914.

Knapp S, Ziegelmaier R, Küpper H. *Toxoplasma gondii* antigens, their production and application. European patents 1991; EP0748815, EP0748816 and EP0751147.

Kompalic-Cristo A, Nogueira SA, Guedes AL, Frota C, Gonzalez LF, Brandão A, et al. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 92-95.

Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* 2005; 118: 212-216.

Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, Ellerbrok H, Siegert W, Janitschke K. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 120-124.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 222: 680-681.

Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanita* 2004; 40: 81-88.

LaRocco Jr A, Sanders JW, Myers JW. Central nervous system toxoplasmosis in AIDS. *N Engl J Med* 1993; 328: 1353.

Lekutis CO, Ferguson DJO, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: Identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol* 2000; 96: 89-96.

Leport C, Raffi F, Matheron S, et al. Treatment of central nervous system toxoplasmosis with pyrimethamine/sulfadiazine combination in 35 patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1988; 84: 94-100.

Leport C, Franck J, Chene G, Derouin F, Ecobichon JL, Pueyo S, et al. Immunoblot profile as predictor of toxoplasmic encephalitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 579-584.

Lerliche MA, Dubremetz JF. Characterization of the proteins content of roptries and dense granule of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45: 249-260.

Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozol* 1980; 27: 37-58.

Li S, Galvan G, Araújo FG, Suzuki Y, Remington JS, Parmley S. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000a; 7: 781-787.

Li S, Maine G, Suzuki Y, Araújo FG, Galvan G, Remington JS, Parmley S. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J Clin Microbiol* 2000b; 38: 179-184.

Liesenfeld O, Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett JG, Merigan TC, Bolognesi D, eds. *Textbook of AIDS medicine*, 2 ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1999. p.225-59.

Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4121-4125.

Logar J, Novak-Antolic Z, Zore A. Serological screening for toxoplasmosis in pregnancy in Slovenia. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 163-164.

Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *JA-MA* 1984; 252: 913-917.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 211-222.

Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1993; 329: 995-1000.

Luft BJ, Chua A. Central Nervous System toxoplasmosis in HIV: pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Curr Infect Dis Rep* 2000; 2: 358-362.

Lycke E, Norrby R, Remington J. Penetration-enhancing factor extracted from *Toxoplasma gondii*, which increases its virulence for mice. *J Bacteriol* 1968; 96: 785-788.

Mamidi A, DeSimone JA, Pomerantz RJ. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol* 2002; 8: 158-167.

Manfredi R, Chiodo CF. Lack of change in the distribution of AIDS-defining opportunistic diseases and the related degree of immunodeficiency during the periods before and after the introduction of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 410-413.

Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* 2003; 17: 1675-1682.

Mariuz P, Bosler E, Luft B. Toxoplasmosis. In: Berger JR, Levy RM, eds. *AIDS and the nervous system*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 641-659.

Meissner M, Reiss M, Viebig N, Carruthers VB, Tourse C, Tomavo S, et al. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J Cell Sci* 2002; 115: 563-574.

Mercier C, Lecordier L, Darcy F, Deslée D, Murray A, Tourvieille B, et al. Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2), associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58: 71-82.

Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Sibley LD. The amphiphatic and alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J Cell Sci* 1998a; 111: 2171-2180.

Mercier C, Howe DK, Mordue D, Lingnau M, Sibley LD. Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases the virulence in mice. *Infect Immun* 1998b; 66: 4176-4182.

Mevelec MN, Chardes T, Mercereau-Puijalon O, Bourguin I, Achbarou A, Dubremetz JF, et al. Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein recognized by mucosal IgA antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 56: 227-238.

Miller SA, Binder EM, Blackman MJ, Carruthers VB, Kim K. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 2001; 276: 45341-45348.

Ministério da Saúde. Dados e pesquisas em DST e AIDS. Disponível em: URL: <http://www.AIDS.gov.br/data/Pages/LUMISD3352823PTBRIE.htm>

Montoya JG, Remington JS. Studies on the serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. *Clin Infect Dis* 1995; 4: 781-789.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet* 2004; 363: 1965-1976.

Morris MT, Coppin A, Tomavo S, Carruthers VB. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. J Biol Chem 2002; 277: 45259-45266.

Navia BA, Petito CK, Gold JW, Cho ES, Jordan BD, Price RW. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. Ann Neurol 1986; 19: 224-238.

Neto EC, Anele E, Rubim R, Brites A, Schulte J, Becker D, et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. Int J Epidemiol 2000; 29: 941-947.

Neyer LE, Grunig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. Role of interleukin-10 in regulation of T cell dependent and T cell independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 1997; 65: 1675-1682.

Nóbrega OT, Karnikowski MGO. An estimation of the frequency of gestacional toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 4: 358-360.

Nockemann S, Dlugonska H, Henrich B, Kitzerow A, Daubener W. Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen (ESA) from *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol 1998; 98: 109-121.

Norrby R, Lycke E. Factors enhancing the host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. J Bacteriol 1967; 93: 53-58.

Norrby R, Lycke E, Remington J. Penetration-enhancing factor extrated from *Toxoplasma gondii* which increases its virulence for mice. J Bacteriol 1968; 96: 785-788.

Novati R, Castagna A, Morsica G, Vago L, Tambussi G, Ghezzi S, et al. Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. *AIDS* 1994; 8: 1691-1694.

Oksenhendler E, Charreau I, Tournerie C, Azihary M, Carbon C, Aboulker JP. *Toxoplasma gondii* infection in advanced HIV infection. *AIDS* 1994; 8: 483-487.

Oliveira JF, Greco DB, Oliveira GC, Christo PP, Guimarães MDC, Corrêa-Oliveira R. Neurological disease in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral treatment: a Brazilian experience. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 2: 146-151.

Odberg-Ferragut C, Soête M, Engels A, Samyn B, Loyens A, Van Beeumen J, et al. Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* SAG4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 82: 237-244.

Ossorio PN, Schwartzman JD, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has an unusual charge asymmetry. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 50: 1-16.

Ossorio PN, Dubremetz JF, Joiner KA. A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associated with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J Biol Chem* 1994; 269: 15350-15357.

Parmley SF, Sgarlato GD, Mark J, Prince JB, Remington JS. Expression, characterization and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1127-1133.

Patel B, Young Y, Duffy K, Tanner RP, Johnson J, Holliman RE. Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. *J Med Microbiol* 1993; 38: 286-292.

Paul WE. Fundamental Immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven 1999; 1589.

Pereira-Chioccola VL, Fragata-Filho AA, Levy AM, Rodrigues MM, Schenkman S. Enzyme-linked immunoassay using recombinant trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* can be employed for monitoring of patients with Chagas' disease after drug treatment. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10: 826-830.

Perkins ME. Roptry organelles of Apicomplexan parasite. Parasitol Today 1992; 8: 28-32.

Pettersen EK. Preparation of *Toxoplasma* antigen for the complement fixation test. Acta Pathology Microbiology Scandinavian 1968; 74: 35.

Petersen E, Dubey JP. Biology of *Toxoplasma gondii*. In: Joynton DH, Wreghitt T. (Eds.), Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p.1-49.

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

Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Stankiewicz M, et al. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 1779-1781.

Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Paul M, et al. Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, GRA7 and SAG1) in an immunoglobulin G avidity test for the serodiagnosis of toxoplasmosis. Parasitol Res 2007 ; 100 : 333-337.

Pinon JM, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A, et al. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1990; 8: 1739-1743.

Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, et al. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2267- 2271.

Pokorny J, Fruhbauer Z, Curik B, Zastera M. A tween-ether preparation of *Toxoplasma gondii* antigen for the complement fixation test. *Bull WHO* 1972; 46: 127.

Portegies P, Solod L, Cinque P, Chaudhuri A, Begovac J, Everall I, et al. Guidelines for the diagnosis and management of neurological complications of HIV infection. *Eur J Neurol* 2004; 11: 297-304.

Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med* 1992; 327: 1643-1648.

Potasman I, Resnick L, Luft BJ, Remington JS. Intrathecal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* in patients with toxoplasmic encephalitis and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Annals Internal Med* 1988; 108: 49-51.

Potasman I, Araújo FG, Desmonts G, Remington JS. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J Infect Dis* 1986; 4: 650-7.

Prigione I, Fachetti P, Lecordier L, Deslée D, Chiesa S, Delawn MFC, et al. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live

tachyzoites: Characterization of fine antigens specificity of the clones and implication for vaccine development. *J Immunol* 2000; 164: 3741-3748.

Prince JB, Araújo FG, Remington JS, Burg JL, Boothroyd JC, Sharma SD. Cloning of cDNAs encoding a 28 kDa antigen of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 34: 3-14.

Priya J, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4499-4503.

Pszenny V, Ledesma BE, Matrajt M, Duschak VG, Bontempi EJ, Dubremetz JF, et al. Subcellular localization and post-secretory targeting of TgP1, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 121: 283-286.

Rabenau KE, Sohrabi A, Tripathy A, Reitter C, Ajioka JW, Tomley FM, et al. TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2. *Mol Microbiol* 2001; 41: 537-547.

Raffi F, Aboulker J, Michelet C, et al. A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. *AIDS* 1997; 11: 177-184.

Raffi F, Franck J, Pelloux H, Derouin F, Reliquet V, Ambroise-Thomas P, et al. Specific anti-toxoplasmic IgG antibody immunoblot profiles in patients with AIDS-associated *Toxoplasma* encephalitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 51-56.

Redlich A, Müller WA. Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res* 1998; 84: 700-706.

Reiss M, Viebig N, Brecht S, Fourmaux MN, Soete M, Di Cristina M, et al. Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. J Cell Biol 2001; 152: 563-578.

Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Dardé ML, Disko R, et al. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. Bull World Health Organ 1999; 77: 929-935.

Remington JS, Klein JO. Infections diseases of the fetus and newborn infant. 4 ed. W B Saunders Company; 1995. p.140-268.

Remington JS, McLeod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: JS Remington e JO Klein (ed.). Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4 ed. W B Saunders Company; 1995. p.140-267.

Renold C, Sugar A, Chave JP, Perrin L, Delavelle J, Pizzolato G, et al. *Toxoplasma* encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Medicine 1992; 71: 224-239.

Rey L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.321-334.

Ribeiro AC, Souza MA, Mineo JR. Detection of antibodies to the 97 kDa component of *Toxoplasma gondii* in samples of human serum. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: 1009-1013.

Roberts CD, Ferguson DJP, Jebbari J, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. Infect Immun 1996; 64: 897-904.

Roberts TC, Storch GA. Multiplex PCR for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. J Clin Microbiol 1997; 35: 268-269.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite *Toxoplasma*. Science 1948; 108: 660-663.

Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger MA, Selnes OA, Miller EN, et al. HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. Neurology 2001; 56: 257-260

Sacktor N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly antiretroviral therapy. J Neurovirol 2002; 8: 115-121.

Saffer LD, Mercereau-Puijalon O, Dubremetz JF, Schwartzman JD. Localization of *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after cell penetration. J Protozool 1992; 39: 526-530.

Sam-Yellowe TY, Shio H, Perkins ME. Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of the host erythrocytes. J Cell Biol 1988; 106: 1507-1513.

Sanchez MCA. Testes Sorológicos. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 9-44.

Scharton-Kersten TM, Wynn TA, Denkers EY, Bala S, Grunvald E, Hieny S, et al. In the absence of endogenous IFN- γ , mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. J Immunol 1996; 157: 4045-4054.

Schoondermark-van de Ven E, Galama J, Kraaijeveld C, van Druten J, Meuwissen J, Melchers W. Value of the polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patients with AIDS. Clin Infect Dis 1993; 16: 661-666.

Schreiber RD, Feldman HA. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. J Infect Dis 1980; 3: 366-369.

Schwab JC, Becjers CJM, Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. Proc Natl Acad Sci 1994; 91: 509-513.

Schwartzman JD. Inhibition of a penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for roptries. Infect Immun 1986; 51: 760-764.

Schwarz JA, Fouts AE, Cummings CA, Ferguson DJP, Boothroyd JC. A novel rhoptry protein in *Toxoplasma gondii* bradyzoites and merozoites. Mol Biochem Parasitol 2005; 144: 159-166.

Scott P, Hunter CA. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. Curr Opin Immunol 2002; 14: 466-470.

Sharma SD. Immunology of toxoplasmosis. In: David JW., Modern Parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects. New York: WH Freeman; 1990. p. 184-189.

Shekarchi IC, Sever JL, Ward LA, Madden DL. Microsticks as solid-phase carriers for enzyme-linked immunosorbent assays. J Clin Microbiol 1982; 16: 1012-1018.

Shekarchi IC, Sever JL, Lee YJ, Castellano G, Madden DL. Evaluation of various plastic microtiter plates with measles, *Toxoplasma*, and gamma globulin antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. J Clin Microbiol 1984; 19: 89-96.

Sibley LD, Neisman JR, Parmley SF, Cesbron-Delauw MF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubule-vesicular

network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci 1995; 108: 1669-1677.

Sibley LD, Hakansson D, Carruthers VB. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. Curr Biol 1998; 8: R12-R14.

Silveira C, Belfort R, Burnier M, Nussenblatt R, Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retino-choroiditis in families. Am J Ophthalmol 1988; 106: 362-364.

Simpson D, Tagliati M. Neurologic manifestation of HIV infection. Ann Intern Med 1994; 121: 769-785.

Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of the host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. J Cell Sci 1997; 110: 2117-2128.

Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole. J Cell Biol 2001; 154: 95-108.

Singh P, Chug TD, Garg P. *Toxoplasma* IHA antibodies in human sera. Indian J Pathol Microbiol 1978; 21: 125-129.

Skiest DJ. Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Clin Infect Dis 2002; 34: 103-115

Smith JE. A ubiquitous Intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 1995; 25: 1301-1309.

Soldati D, Kim K, Kampmeier J, Drumetz JF, Boothroyd JC. Complementation of *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection. Mol Biochem Parasitol 1995; 74: 87-97.

Soldati D, Meissner M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. Review. Curr Opin Cell Biol 2004; 16: 32-40.

Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. An Acad Bras Cienc 2006; 78: 271-291.

Souza MA, Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto Junior S, Ferreira MS. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. Ver Soc Bras Med Trop 2005; 38: 137-141.

Spano F, Ricci I, Di Cristina M, Possenti A, Tinti M, Dendougrl N, et al. The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to the SAG1 family of surface antigens. Int J Parasitol 2002; 32: 121-131.

Speer CA, Tilley M, Temple ME, Blixt JA, Dubey JP, White MW. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. Mol Biochem Parasitol 1995; 75: 75-86.

Speer CA, Dubey JP, Blixt JA, Prokop K. Time lapse video microscopy and ultrastructure of penetrating sporozoites, types 1 and 2 parasitophorous vacuoles of the VEG strain of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 1997; 83: 565-574.

Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. Crit Rev Microbiol 2002; 28: 187-248.

Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. J Infect Dis 1990; 1: 270-273.

Suzuki Y, Ramirez R, Press C, Li S, Parmley S, Thulliez P, et al. Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women. J Clin Microbiol 2000; 38: 3967-3970.

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

Thulliez P. Commentary: Efficacy of prenatal treatment for toxoplasmosis: a possibility that cannot be ruled out. Int J Epidemiol 2001; 30: 1315-1316.

Tomavo S, Dubremetz JF, Schwarz RT. Structural analysis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface glycoprotein gp23. Biol Cell 1993; 78:155-62.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Nat Acad Sci USA 1979; 76: 4350-4357.

UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/AIDS disponível :
URL:http://www.unAIDS.org/epi/2005/doc/EPIupdaté2005_html_en/epi05_02_en.htm

Van Gelder VF, Bosman F, De Meuter F, Van Heuverswyn H, Hérion P. Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1993; 31: 9-15.

Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. Parasitol Today 1993; 9: 228-232.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC. Importance of *Toxoplasma gondii* antibody titres in patients with toxoplasmic encephalitis and AIDS. J Neurovirol 2002; 8: 91.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV. Prognostic factors of clinical response in patients with toxoplasmic encephalitis and AIDS in the HAART era. J Neurovirol 2003; 60: 16-17.

Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4765-4768.

Vidal, JE, Hernandez AV, Penalva de Oliveira AC, Dauar R, Barboza SP, Focaccia R. Cerebral toxoplasmosis in HIV-Positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care STDS*. 2005; 19: 840-848.

Villard O, Filisetti D, Roch-Deries F, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3537-3541.

Voller A, Didweel DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J Clin Pathol* 1976; 29: 150-153.

Wainstein MV, Wolffenbuttel L, Lopes DK, et al. Sensibilidade e especificidade do diagnóstico clínico, sorológico e tomográfico da encefalite por *Toxoplasma gondii* na síndrome da imunodeficiência adquirida. *Ver Soc Brás Méd Trop* 1993; 26: 71-75.

Wan KL, Carruters VB, Sibley LD, Ajioka JW. Molecular characterization of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemial protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 84: 203-214.

Wanke C, Tuazon CV, Kovacs A, et al. *Toxoplasma* encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome: diagnosis and response to therapy. *Am J Trop Hyg* 1987; 36: 509-516.

Weiss LM, Kim K. The development in biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* 2000; 5: 391-405.

Wong SY, Remington JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS 1993; 7: 299-316.

Yamamoto YI, Mineo Jr, Meneghisse CS, Guimarães AC, Kawarabayashi M. Detection in human serum of IgG, IgM and IgA to excreted-secreted antigens from *Toxoplasma gondii* by use of dot-ELISA and immunoblot assay. Ann Trop Med Parasitol 1998; 92: 23-30.

Yap GS, Sher A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ -and tumor necrosis factor (TNF)- α -dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. J Exp Med 1999; 189: 1083-1092.

Zhou XW, Kafsack BFC, Cole RN, Bekett P, Shen RF, Carruthers VB. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. J Biol Chem 2005; 280: 34233-34244.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEPIAL

São Paulo, 17 de janeiro de 2006 .

Ilmo(a) Sr(a).: **VERA LUCIA PEREIRA CHIOCCOLA**

Coordenador(a) do Projeto de Pesquisa: **IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS ANTÍGENOS DE *Toxoplasma gondii* COMO MARCADORES DA TOXOPLASMOSE CEREBRAL EM PACIENTES COM AIDS.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião ordinária do mês JANEIRO, apresentou o PARECER, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS , Brasília, 1996.

Atenciosamente


Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL

Anexo 2 - Parecer do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



APROVAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA

IAL/CCD/CEPIAL/CTC
PROJETO CCD- BM-Nº 46/05

Coordenadora: Vera Lucia P Chioccola

Projeto: Identificação de possíveis antígenos de *Toxoplasma gondii* com marcadores da toxoplasmose cerebral em pacientes com Aids.

Senhora Coordenadora:

Comunicamos que o projeto supra citado foi cadastrado no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação na CCD/BM e CEPIAL.

Início: 2005

Término: 2007

Recebido no CTC/IAL e cadastrado em 03/03/2006

Myrna Sabino

Presidente do CTC/IAL

Via 1: Coordenador

Via 2: CCD/BM

Via 3: CTC

Anexo 3 – Prêmio de Honra ao Mérito na Área de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública do V Encontro do Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD, da Secretaria de Estado da Saúde – São Paulo/SP, em 2006.



Anexo 4 - Carta de Informações ao Paciente

Nome do estudo: Identificação de possíveis antígenos de *Toxoplasma gondii* como marcadores da toxoplasmose cerebral em pacientes com aids.

Você (ou seu familiar) foi admitido neste hospital devido a uma doença infecciosa conhecida como toxoplasmose cerebral. A toxoplasmose é causada por um parasita chamado *Toxoplasma gondii* que acomete principalmente o cérebro e manifesta-se com alterações do sistema nervoso como dor de cabeça, convulsões, fraqueza, sonolência, confusão, dentre outras.

A suspeita diagnóstica da toxoplasmose utiliza dados clínicos e das imagens do cérebro (tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética), a qual demonstra geralmente várias lesões tumorais no cérebro. Duas semanas depois de iniciado o tratamento para essa doença a grande maioria dos pacientes apresentam melhora nas suas queixas e também nas imagens do cérebro. Um pequeno grupo de pacientes não melhora com o tratamento, sendo necessário a realização de uma biópsia do cérebro (que consiste em retirar um pequeno fragmento do cérebro para seu posterior estudo), procedimento que tem como principal risco o sangramento, porém que oferece a oportunidade de fazer o diagnóstico e ajudar a tratar a doença.

Estamos realizando uma pesquisa com o objetivo de demonstrar a utilidade de alguns exames que possam ajudar a diagnosticar a toxoplasmose de uma forma rápida e segura, tentando evitar a realização de procedimentos mais agressivos como a punção das costas (para obter líquido da espinha) ou as biópsias de cérebro.

Esta pesquisa envolve a coleta de amostra de sangue em pacientes com toxoplasmose cerebral internados no hospital e em indivíduos que não tem a doença. As amostras de sangue permitirão estabelecer a utilidade das provas que estamos avaliando. Serão necessários que 106 pacientes com

toxoplasmose cerebral e 194 pacientes sem toxoplasmose cerebral participem deste estudo para chegarmos às conclusões necessárias. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício dos exames que estamos avaliando.

O objetivo deste termo é convidá-lo (você ou seu parente) a participar da pesquisa. Caso você aceite participar, será colhida uma amostra de sangue de 15 ml, que servirá apenas e tão somente para o processamento dos exames que estamos estudando.

O seu tratamento prosseguirá normalmente a cargo dos médicos que lhe acompanham, e não será modificado de maneira alguma caso você participe ou não da pesquisa.

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os dados serão armazenados em um computador sem identificação, e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação. Você poderá ter acesso aos resultados dos seus exames colhidos durante o estudo, bem como terá acesso, se assim desejar, as publicações pertinentes. Este estudo foi revisado e aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa e está de acordo com a Declaração de Helsinque que regulamenta a pesquisa médica em humanos.

A sua participação neste estudo é voluntária. Este estudo não implica qualquer ônus para o paciente, assim como não trará nenhuma despesa financeira por sua participação.

Caso você decida não participar, os cuidados médicos que você recebe não serão afetados de qualquer forma. Caso aceite, você poderá retirar-se do estudo em qualquer momento, sem afetar os cuidados médicos.

Por favor, sinta-se a vontade para discutir qualquer aspecto referente a este protocolo com os médicos pesquisadores responsáveis por este estudo Dr. José Vidal Bermúdez (telefone 9588-8756, email: ibermudez@emilioribas.sp.gov.br), ou Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira (telefone 9933-2917, e-mail: rdcassia@uol.com.br).

Adicionalmente, você poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas através do telefone 3896-1281.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, abaixo assinado, afirmo que li na íntegra e entendi completamente a Carta de Informações. Concordo que as informações a respeito de minha condição médica e os resultados obtidos através de meu sangue podem ser usadas neste estudo. Entendo que mediante qualquer dúvida relacionado a este estudo poderei discutir com os Drs. José Vidal Bermúdez e Augusto César Penalva de Oliveira. Minha participação é voluntária e livre de qualquer tipo de pressão ou coação. Da mesma maneira, poderei me desligar do estudo em qualquer fase de evolução, sem qualquer penalidade ou ônus ao meu atendimento pela Instituição.

Eu entendo que as informações serão confidenciais e que meu nome não será mencionado em qualquer publicação deste estudo.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ___/___/___.

Nome do investigador : _____

Assinatura: _____

Data: ___/___/___.

Se o paciente não puder assinar:

Nome do representante: _____

Grau de parentesco: _____

Assinatura: _____

Data: ___/___/___.

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](#)