

Ingrid de Siqueira Pereira

Expressão gênica de miRNA na toxoplasmose cerebral

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.

Coorientadora: Profa. Dra. Cristina da Silva Meira-Strejevitch.

São Paulo
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Pereira, Ingrid de Siqueira

Expressão gênica de miRNA na toxoplasmose cerebral/ Ingrid de Siqueira Pereira. -2019.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola.

1. Toxoplasmose cerebral.
2. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida.
3. Expressão gênica.
4. MicroRNAs.

SES/CCD/CD-398/2019

Dedico este trabalho à minha mãe,
pelo esforço que fez para eu chegar até aqui,
por sempre valorizar cada passo que foi dado
e por nunca deixar de incentivar meus sonhos.

E em memória a minha avó,
tenho certeza que ela se orgulharia
muito com a minha conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que sou e por tudo que tenho. Por ter me dado sabedoria e discernimento para fazer as escolhas que me levaram a ingressar na pós-graduação, por não me permitir perder a fé, por guiar os meus passos e me dar força para chegar até o fim.

Aos meus irmãos e tios por se orgulharem sempre de mim e das minhas conquistas, por sempre acreditarem e torcerem pelo meu sucesso profissional e pessoal.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola, pela oportunidade, pelo voto de confiança e por ter me conduzido com tanta sabedoria. Pesquisadora brilhante, que contagia com o seu entusiasmo pela ciência e pela vida, sempre incentivando em extrair o melhor de cada um. Minha eterna gratidão, admiração e orgulho por ter sido sua aluna.

À minha coorientadora, Prof^a. Dra. Cristina da Silva Meira-Strejevitch, pela grande contribuição prestada para melhoria deste trabalho, pela disponibilidade em me acompanhar em muitos momentos nesta pesquisa, pelos momentos divertidos e conversas durante esse período e por tantos ensinamentos valiosos, se tornando uma modelo de profissional que eu quero ser um dia.

Às amigas de laboratório Alle e Marta, por fazerem parte da minha rotina nos últimos anos, onde dividimos não só a “bancada”, mas compartilhamos histórias, multiplicamos conhecimentos, sonhos e alegrias. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório Cida, Margarete e Ricardo pelo suporte técnico, colaboração, pelos momentos de descontração, pelas experiências divididas e pela agradável presença de todos os dias.

À Maiara Amaral, Maiara Romanelli, Milena, Talita e Viviane pelo companheirismo nas aulas e principalmente pela amizade, palavras de incentivo e desabafos.

Aos meus grandes amigos, pelas infindáveis razões que os fazem tão importantes na minha caminhada. Obrigada por compreenderem a minha ausência nesse período e mesmo assim continuarem apoiando e festejando as minhas conquistas.

Às pesquisadoras Cristina da Silva Meira-Strejevitch, Gabriela Motoie e Leyva Cecília Vieira de Melo pelo convívio, companheirismo e por permitirem meu ingresso no Programa de Aprimoramento Profissional (PAP), onde iniciei a minha caminhada na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cyro Alves de Brito (IAL-SP), Prof^a. Dra. Kátia Cristina Pereira Oliveira Santos (UNIFESP), Prof^a Dra. Thaís Alves da Costa Silva (UFABC-SP), integrantes da banca de qualificação, pelas valiosas contribuições e sugestões oferecidas para o enriquecimento deste trabalho. Um agradecimento especial a Prof^a. Dra. Kátia, pelo auxílio e acolhimento em seu laboratório.

Por fim, a todos que não foram mencionados, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram das mais diferentes maneiras com a concretização de mais uma etapa em minha vida.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP)

Ingrid de Siqueira Pereira teve apoio financeiro da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”.

Galileu Galilei

RESUMO

A toxoplasmose constitui um sério problema de saúde pública, principalmente em pacientes imunocomprometidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Apesar do acesso universal e gratuito à terapia antirretroviral (TARV) e a diminuição dos casos, a toxoplasmose cerebral ainda é responsável por alta morbidade e mortalidade, além de representar um determinante de mau prognóstico nesses pacientes. Os miRNAs são moléculas que exercem um importante papel na regulação da expressão gênica em células eucariontes. Sendo assim, há muito potencial para serem utilizados para o diagnóstico, prognóstico e intervenções terapêuticas. Diante disso, este estudo avaliou os níveis de expressão dos miRNAs miR-146a, miR-21, miR-155, miR-125b e miR-29c em plasma de pacientes com toxoplasmose cerebral e aids (TC/aids). Foram analisadas 79 amostras de plasma divididas em três grupos: grupo I- 32 amostras de plasma de pacientes TC/aids; grupo II- 27 amostras de plasma de indivíduos assintomáticos e soropositivos para toxoplasmose (TA) e grupo III- 20 amostras de indivíduos soronegativos para toxoplasmose (CN). Após a extração de RNA total contendo miRNA foi realizada a síntese do DNA complementar e em seguida o perfil de expressão de cada miRNA foi determinado por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados foram expressos em quantificação relativa e mostraram que o miR-146a e o miR-21 foram significativamente mais expressos nos pacientes com toxoplasmose cerebral e aids quando comparados com os indivíduos assintomáticos e soropositivos para toxoplasmose. Em relação aos miR-155, miR-125b e miR-29c não houveram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados. Até o momento, este é o primeiro estudo a investigar a expressão de miRNAs em pacientes com toxoplasmose cerebral e aids abrindo perspectivas para futuros estudos a cerca do seu emprego no diagnóstico, prognóstico e aplicação clínica.

Palavras-chave: toxoplasmose cerebral, aids, expressão gênica, miRNA.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is an important public health problem, especially in immunocompromised patients, such as those with human immunodeficiency virus (HIV). Despite free universal access to antiretroviral therapy (HAART), cerebral toxoplasmosis is still responsible for high morbidity, mortality—and a determinant of worst prognosis. MicroRNAs are molecules that play an important role in gene expression in eukaryotic cells. Therefore, these molecules have the potential to be used for diagnosis, prognosis and therapeutic. This study evaluated the miRNA expression levels of miR-146a, miR-21, miR-155, miR125b and miR-29c in plasma of patients with cerebral toxoplasmosis/aids (TC/AIDS). A total of 79 plasma samples were divided into three groups. Group I: 32 plasma samples from TC/aids patients. Group II: 27 plasma samples from individuals with asymptomatic toxoplasmosis, ~~seropositives for toxopalsmosis~~ (TA). Group III: 20 plasma samples from seronegative individuals for toxoplasmosis (CN). After extraction of total RNA, containing miRNA, a complementary DNA synthesis was performed and, then, the expression profile of each target miRNA, which was determined by quantitative real-time PCR (qPCR). Results expressed as relative quantification (RQ) showed that miR-146a and miR-21 were significantly up-expressed in TC/AIDS patients, when compared with TA individuals. Analyzes of miR-155, miR-125b and miR-29c showed that no statistically significant differences were shown between TC/AIDS and TA groups. These results suggest the host miRNAs modulation by *T. gondii*. This is the first study to investigate miRNA expression in TC/AIDS patients. These data can open prespectives for new investigations for diagnosis and clinical application.

Keywords: cerebral toxoplasmosis, AIDS, gene expression, miRNA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ago**- Argonauta
- aids** -Síndrome da imunodeficiência adquirida
- APC**- Células apresentadoras de antígenos
- AVC**- acidente vascular cerebral
- CD4+** - Cluster of Differentiation
- cDNA** - DNA complementar
- CT** - “*Cycle threshold*” - Limiar do ciclo
- DCs**- Células dendríticas
- DEPC**-“Diethylpyrocarbonate” - Pirocarbonato de dietila
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- ELISA** - “*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*” - Ensaio imunoenzimático
- g** - Aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s²)
- HIV** - Vírus da imunodeficiência humana
- IFN-γ** -Interferon gamma
- IgG** - Imunoglobulina da classe G
- IgM** - Imunoglobulina da classe M
- IL** -Interleucina
- in vitro*** - do latim, em vidro (referência utilizada para processos biológicos que são realizadas em lugares fora dos sistemas vivos).
- IRAK-1**- IL-1R-associated kinases (quinase associada ao receptor da IL-1)
- LCR**- Líquido cefalorraquidiano
- mRNA**- RNA mensageiro
- miRNA**- MicroRNA
- NF-κB**- Fator nuclear kappaB
- NK** - “Natural Killer Cell” - Células exterminadoras naturais
- PCR**-“Polimerase chain reaction” - Reação em cadeia da polimerase
- qPCR**- PCR em tempo real
- RIFI**- Reação de imunofluorescência indireta
- RISC**- Complexo de silenciamento induzido por RNA

RM- Ressonância magnética

RNA- Ácido Ribonucleico

SNC- Sistema nervoso central

TARV- terapia antirretroviral

TC -Tomografia computadorizada

TE- Encefalite Toxoplasmática

Th1 – resposta celular do tipo 1

Th2 – resposta celular do tipo 2

TLR- Toll-like

TNF-Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)

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

TNFRSF1A- Receptor de TNF 1A

TRAF6- TNF receptor-associated factor 6 (Fator associado ao receptor do TNF)

T_{reg}- células T reguladoras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Formas esquemáticas dos estados evolutivos de *Toxoplasma gondii*: A) Oocistos maduro e imaturo; B) Taquizoítos (T) dentro do vacúolo parasitóforo (VP) em um macrófago destacando-se o núcleo (Nm) do macrófago; C) Cisto com bradizoítos (Bra) em tecido muscular.....21

Figura 2- Representação esquemática da morfologia geral da forma taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.....22

Figura 3- Ciclo de transmissão de *Toxoplasma gondii*. 1- Oocistos não esporulados são eliminados nas fezes do gato e levam de 1 a 5 dias para esporular no ambiente e se tornarem infecciosos. Hospedeiros intermediários (incluindo aves e roedores) se infectam após a ingestão de solo, água ou alimentos contaminados com oocistos. 2- Oocistos se transformam em taquizoítos logo após a ingestão, migram para o tecido neural e muscular e evoluem para cistos contendo bradizoítos. 3- Gatos são infectados após consumir hospedeiros intermediários que hospedam cistos teciduais. 4- Os gatos também podem ser infectados com a ingestão de oocistos esporulados no ambiente. 5- Os seres humanos podem ser infectados por qualquer uma das vias: 6- comer carne crua ou mal cozida de animais que abrigam cistos teciduais, 7- consumir alimentos ou água contaminada com fezes de gatos ou por amostras ambientais contaminadas (como solo contaminado), 8- transfusão sanguínea ou transplante de órgãos e por 9- Via transplacentária de mãe para feto. 10- No hospedeiro humano, os parasitas formam cistos teciduais podendo permanecer durante toda a vida do hospedeiro. O diagnóstico geralmente é realizado por sorologia, embora cistos teciduais possam ser observados em amostras de biópsia coradas. 11- O diagnóstico de infecções congênicas pode ser alcançado pela detecção do DNA de *T. gondii* no líquido amniótico usando métodos moleculares como a PCR.....25

Figura 4- Retinocoroidite causada pela toxoplasmose.....29

Figura 5- Mapa ilustrando a situação Global da soroprevalência de *Toxoplasma gondii*. Em vermelho escuro a prevalência é igual ou acima de 60%, vermelha é de 40-60%, amarelo de 20-40%, azul de 10-20% e verde prevalência menor que 10%. Branco é igual a ausência de dados.....34

Figura 6- Imagens de tomografia computadorizada de pacientes com toxoplasmose cerebral com contraste/ressonância magnética. As setas mostram as anormalidades. Lesões expansivas com realce anelar (A); com realce nodular (B); sem realce após injeção do contraste (C); a tomografia computadorizada com realce pelo contraste não mostrou anormalidades (D) lesões focais com sinais de alta intensidade (E) nódulo assimétrico aprimorado ao longo da parede da lesão (F).....38

Figura 7- Processo de biogênese do miRNA. Os miRNAs são inicialmente transcritos como pri-miRNA (1) que são processados em pré-miRNA dentro do núcleo (2). Os pré-miRNA são exportados para o citoplasma (3), onde são processados em miRNA maduro (4) e carregados no complexo de silenciamento induzido por RNA- RISC (5). Os miRNAs maduros guiam o RISC para direcionar os transcritos de mRNA selecionados para silenciamento ou degradação (6 e 7).....43

Figura 8- Média de estabilidade de expressão (Índice M). O miRNA mais estável é o que apresentou valor de M inferior a 1,5.....66

Figura 9- Quantificação relativa dos níveis de miR-146a do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ obtidos pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.10.2, de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (** $p=0,0011$).....67

Figura 10- Quantificação relativa dos níveis de miR-21 do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ após o cálculo determinado pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (**** $p < 0,0001$).....67

Figura 11- Quantificação relativa dos níveis de miR-155 do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ após o cálculo determinado pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (* $p < 0,0334$).....68

Figura 12- Quantificação relativa dos níveis de miR-125b do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ após o cálculo determinado pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (** $p < 0,0049$).....69

Figura 13- Quantificação relativa dos níveis de miR-29c do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ após o cálculo determinado pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (* $p < 0,0181$).....69

Figura 14- Comparação da quantificação relativa dos níveis de miRNAs investigados em plasma de pacientes com toxoplasmose cerebral/aids e indivíduos assintomáticos e soropositivos para toxoplasmose. Os valores são expressos em RQ após o cálculo obtido pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças dos níveis de expressão de miR-146a (* $p < 0,0177$) e do miR-21 (* $p < 0,0302$) foram estatisticamente significantes.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Etapas do protocolo de síntese de cDNA.....	57
Tabela 2- miRNAs investigados neste estudo.....	58
Tabela 3- Resultados clínicos e laboratoriais das amostras.....	62
Tabela 4- Média de Ct do controle exógeno (cel-miR-39)	63
Tabela 5- Quantificação de RNA total e miRNA das amostras de plasma utilizadas neste estudo.....	64
Tabela 6- Valor de $2^{-\Delta CT}$ para os genes endógenos.....	65

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Histórico.....	19
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	20
1.2.1. Taquizoítos.....	21
1.2.2. Bradizoítos.....	23
1.2.3. Oocistos.....	24
1.3. Ciclo biológico.....	24
1.4. Formas clínicas.....	27
1.4.1. Toxoplasmose em imunocompetentes.....	28
1.4.2. Toxoplasmose ocular.....	28
1.4.3. Toxoplasmose gestacional e congênita.....	29
1.4.4. Toxoplasmose adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos.....	31
1.5. Epidemiologia da toxoplasmose.....	32
1.5.1. Epidemiologia da toxoplasmose cerebral e aids.....	34
1.6. Diagnóstico da toxoplasmose.....	36
1.6.1. Diagnóstico da toxoplasmose cerebral.....	37
1.7. A resposta imune do hospedeiro.....	39
1.8. Micro-RNA (miRNA).....	40
1.8.1. Biogênese de miRNAs.....	41
1.8.2. Mecanismo de ação de miRNAs.....	43
1.8.3. Potencial aplicação dos miRNAs.....	44
1.8.4. Funções dos miRNAs.....	45
1.9. Análise da Expressão Gênica.....	48
1.10. Justificativa.....	49
2. OBJETIVOS	50
2.1. Objetivo Geral.....	50
2.2. Objetivos Específicos.....	50

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. Considerações éticas.....	51
3.2. Delineamento experimental.....	51
3.3. Pacientes e amostras clínicas.....	52
3.4. Diagnóstico da toxoplasmose.....	52
3.4.1. Sorológico.....	52
3.4.2. Molecular.....	53
3.5. Extração de RNA total contendo miRNA.....	53
3.6. Análise da concentração das amostras.....	55
3.7. Síntese do DNA complementar (cDNA)	55
3.8. qPCR.....	55
3.9. Padronização da expressão dos genes endógenos.....	59
3.10. Análise dos dados.....	59
3.10.1. Avaliação da expressão dos genes endógenos.....	59
3.10.2. Cálculo da quantificação de expressão gênica.....	60
3.10.3. Análises estatísticas.....	61
4. RESULTADOS.....	62
4.1. Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose.....	62
4.2. Controle exógeno.....	62
4.3. Quantificação de RNA total e miRNA.....	63
4.4. Determinação dos genes endógenos candidatos.....	64
4.5. Expressão gênica dos miRNAs alvos.....	66
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8. ANEXOS.....	
8.1. Anexo 1- Comitê de Ética em Pesquisa.....	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais prevalentes em todo o mundo. É uma doença infecciosa, congênita ou adquirida, geralmente de forma assintomática e autolimitada, pode afetar tanto o homem como outros animais de sangue quente (Montoya e Liesenfeld, 2004). É causada por um protozoário intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*, o qual apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em todos os continentes, o que o caracteriza como um agente etiológico cosmopolita (Dressen, 1990).

T. gondii foi descrito em 1908, simultaneamente por Afonso Splendore, em coelhos *Oryctolagus cuniculus*, no Brasil, e por Nicolle e Manceaux em células mononucleares do baço e do fígado de um roedor *Ctenodactylus gundii*, no Instituto Pasteur da Tunísia, norte da África (Rey, 1991, 2001).

O parasita foi considerado protozoário, por apresentar semelhanças com as leishmanias e ambos os grupos de pesquisadores pensaram inicialmente se tratar de um parasita pertencente ao gênero *Leishmania*. No entanto, posteriormente os autores Nicolle e Manceaux (1909) reconheceram que se tratava de um novo parasita, introduzindo o gênero *Toxoplasma*, nomeando a espécie *Toxoplasma gondii*.

O primeiro caso de toxoplasmose no homem foi descrito em 1923 por Janku, na cidade de Praga, em uma criança com sinais clínicos de meningoencefalite (Remington et al., 2006). Pinkerton e Weinman (1940) registraram o primeiro caso de infecção por via não congênita em um adolescente que faleceu com toxoplasmose disseminada.

Em 1948, Sabin e Feldman desenvolveram o primeiro teste sorológico para o diagnóstico da toxoplasmose, conhecido como teste do corante (dye test), que permitiu numerosas investigações epidemiológicas e clínicas. Porém, somente a partir da década de 70, após o desenvolvimento desse

teste sorológico, que se tornou possível demonstrar a ampla distribuição geográfica da doença em todo mundo, possibilitando a realização de inquéritos epidemiológicos (Neves, 2000).

Em 1969, 60 anos após a descoberta do parasita, Frenkel, Dubey e Miller reconheceram que se tratava de um protozoário coccídeo e descreveram por completo o ciclo biológico, após a descoberta da fase sexuada de multiplicação no intestino delgado do gato tendo como hospedeiros definitivos os felídeos, em geral, e, como hospedeiros intermediários, os mamíferos e as aves (Dubey et al., 1970).

A partir de 1981, com o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), a toxoplasmose tornou-se amplamente conhecida devido a morbidade e mortalidade em indivíduos imunossuprimidos cronicamente infectados, em virtude da gravidade da reativação nesses pacientes (Israelki e Remington, 1988).

1.2. *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidia, Sub-ordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (Levine et al., 1980; Levine, 1988; Adl et al., 2012).

O termo *Toxoplasma* deve-se a forma em lua crescente dos taquizoítos (em grego, toxon = arco, plasma = forma), e *gondii* em referência ao roedor de onde se isolou o parasita, *Ctenodactylus gundi* (Black e Boothroyd, 2000).

T. gondii infecta todas as células nucleadas e diversos tecidos, tendo preferência por macrófagos teciduais. São encontrados, também, em secreções, células endoteliais, nervosas e musculares (Dubey, 2010a; Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Dlugonska, 2014).

T. gondii apresenta organelas citoplasmáticas, características do filo Apicomplexa, que constituem o complexo apical: róptrias, micronemas e grânulos densos; e de elementos do citoesqueleto, dentre eles o conoide, anéis polares e microtúbulos subpeliculares. Outra organela típica do parasita é o apicoplasto, envolto por quatro membranas e localizado na região anterior ao núcleo (Dubey, 2008).

Este protozoário apresenta três formas morfológicas distintas ao longo do seu ciclo de vida (Figura 1), tanto para os hospedeiros definitivos como para os hospedeiros intermediários: os taquizoítos (formas livres), bradizoítos (cistos teciduais) e oocistos contendo esporozoítos (Dubey, 2008; Souza et al., 2010).

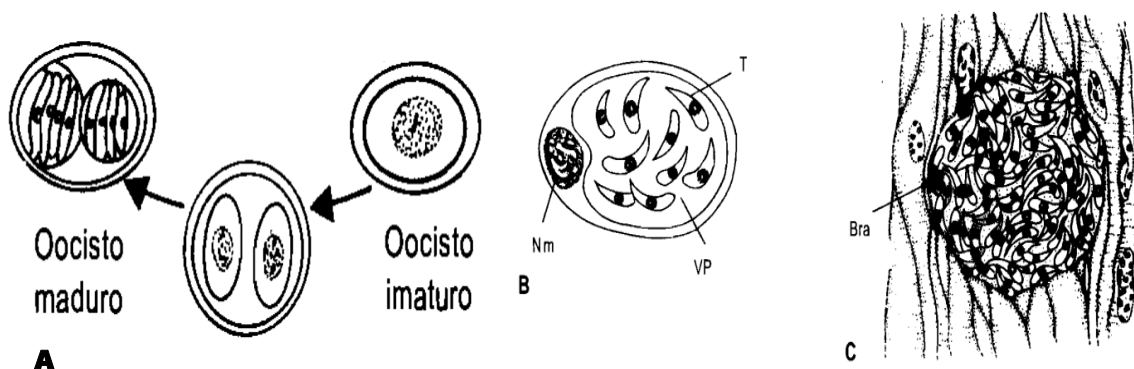


Figura 1. Formas esquemáticas dos estados evolutivos de *Toxoplasma gondii*: A) Oocistos maduros e imaturos; B) Taquizoítos (T) dentro do vacúolo parasitóforo (VP) em um macrófago destacando-se o núcleo (Nm) do macrófago; C) Cisto com bradizoítos (Bra) em tecido muscular. Fonte: Neves et al., 2004.

1.2.1. Taquizoítos

O termo taquizoíto proveniente do grego *taqui* (rápido) descreve as formas de multiplicação rápida de toxoplasma nas células (Frenkel, 1973). Responsáveis pela fase aguda da infecção estão presentes no sangue, excreções e secreções.

Exibem formato de meia-lua, medem cerca de 2 μm de largura e 6 μm de comprimento, apresentam uma extremidade anterior afilada (conoide) e

uma extremidade posterior arredondada. Na extremidade anterior estão localizados os anéis polares, o conoide, cinco a oito róptrias e os micronemas. Estas estruturas formam o complexo apical, que possui mobilidade e participa das ações necessárias à penetração nas células do hospedeiro. O núcleo localiza-se na região central do corpo do parasita (Hu et al., 2006; Souza et al., 2010, Hill e Dubey, 2016) (Figura 2).

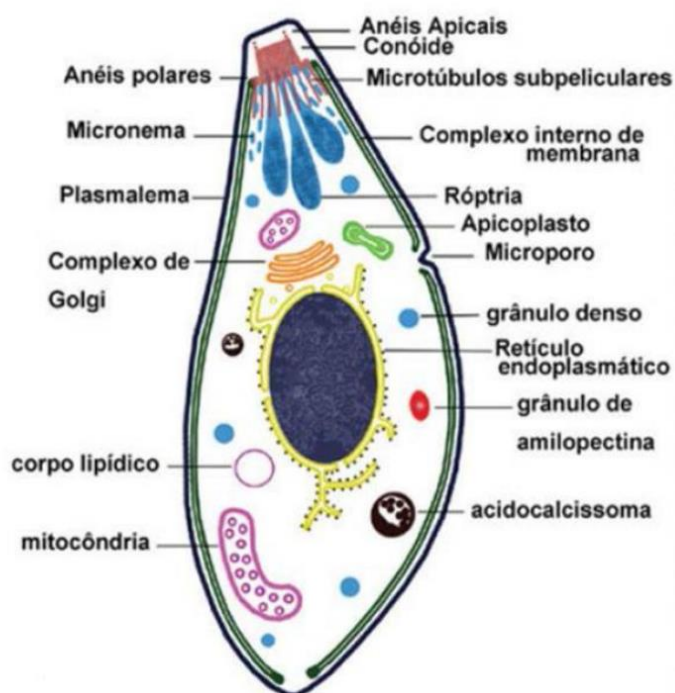


Figura 2. Representação esquemática da morfologia geral da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*.
Fonte: Souza et al., 2010.

Os taquizoítos invadem diversos tipos de células do hospedeiro por penetração ativa e, após a invasão, se multiplicam rapidamente no interior do vacúolo parasitóforo formando rosetas (Hill e Dubey, 2002). Multiplicam-se assexuadamente por repetidas endodiogenias, em que duas células-filhas se formam no interior da célula-mãe, sendo a célula-mãe destruída para dar lugar às células filhas (Blader et al., 2015).

Depois de várias replicações, o citoplasma da célula parasitada fica repleto, os parasitas rompem a membrana da célula e se disseminam pela corrente sanguínea para vários tecidos (Amato e Marchi, 2002).

1.2.2. Bradizoítos

Após algumas divisões os parasitas formam os bradizoítos encerrados em cistos teciduais que se alojam no interior dos tecidos. Podem permanecer viáveis por toda a vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória ou algum dano tecidual. O termo bradizoíto (*brady* = devagar em grego) foi definido por Frenkel (1973) e descreve a forma de multiplicação lenta dentro do cisto. Sob determinadas condições é possível uma reinfecção, causada pelo rompimento desses cistos, onde os bradizoítos se transformam em taquizoítos promovendo uma nova infecção (Hill e Dubey, 2016). São as formas de resistência do parasita e podem ser frequentemente encontrados no cérebro, coração, músculo esquelético e retina. Podem, também, habitar pulmão, fígado e rim (Hill et al., 2005). Os bradizoítos se dividem como os taquizoítos por endodiogenia (Dubey, 1998), e medem aproximadamente 7 μm x 1,5 μm . Diferem-se morfológicamente dos taquizoítos em dimensão, quantidade de micronemas e grânulos de amilopectina, bem como, a posição do núcleo, que se situa próximo da extremidade posterior (Hill et al., 2005).

Além das diferenças morfológicas, existem também diferenças biológicas. A parede cística e a matriz protegem os bradizoítos das condições do ambiente e também promovem uma barreira física contra o sistema imune do hospedeiro (Weiss e Kim, 2000).

1.2.3. Oocistos

Os oocistos são as formas infectantes resultantes do ciclo sexuado que ocorre somente no trato gastrointestinal dos felídeos com primo-infecção.

São liberados nas fezes por cerca de sete a dez dias ainda não esporulados, e em condições adequadas de temperatura e umidade esporulam em até 21 dias se tornando infectantes. Após a maturação os oocistos podem sobreviver de 12 a 18 meses no solo (Rey, 2001).

Oocistos são formas de resistência ambiental no ciclo de vida dos coccídeos. Estes medem de 10 a 12 μm de diâmetro, com parede celular bem evidente. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos. Os esporozoítos medem, em média, cerca de 2 μm por 6 μm . Menos que 50% dos gatos liberam oocistos nas fezes quando ingerem taquizoítos ou oocistos. Todavia quase todos os gatos liberam oocistos quando ingerem cistos teciduais (Dubey e Frenkel, 1976; Hill e Dubey, 2016).

1.3. Ciclo biológico

O ciclo de *T. gondii*, descrito em 1970, é heteroxênico, pois, ocorre em duas fases distintas. Conforme definido por Frenkel et al. (1970), a fase sexuada acontece no hospedeiro definitivo, e não apenas no gato, mas sim nos felídeos em geral. A fase assexuada ocorre no hospedeiro intermediário que pode ser o homem, outros mamíferos e aves.

Todas as formas evolutivas de *T. gondii* são infectantes para os hospedeiros. A transmissão pode ocorrer pela via horizontal, que ocorre quando há ingestão de taquizoítos, oocistos esporulados ou de cistos contendo bradizoítos. Pela via vertical ocorre quando há passagem transplacentária de taquizoítos da mãe para o feto, principalmente na primoinfecção, como mostra a figura 3 (Oliveira e Bevilacqua, 2004).

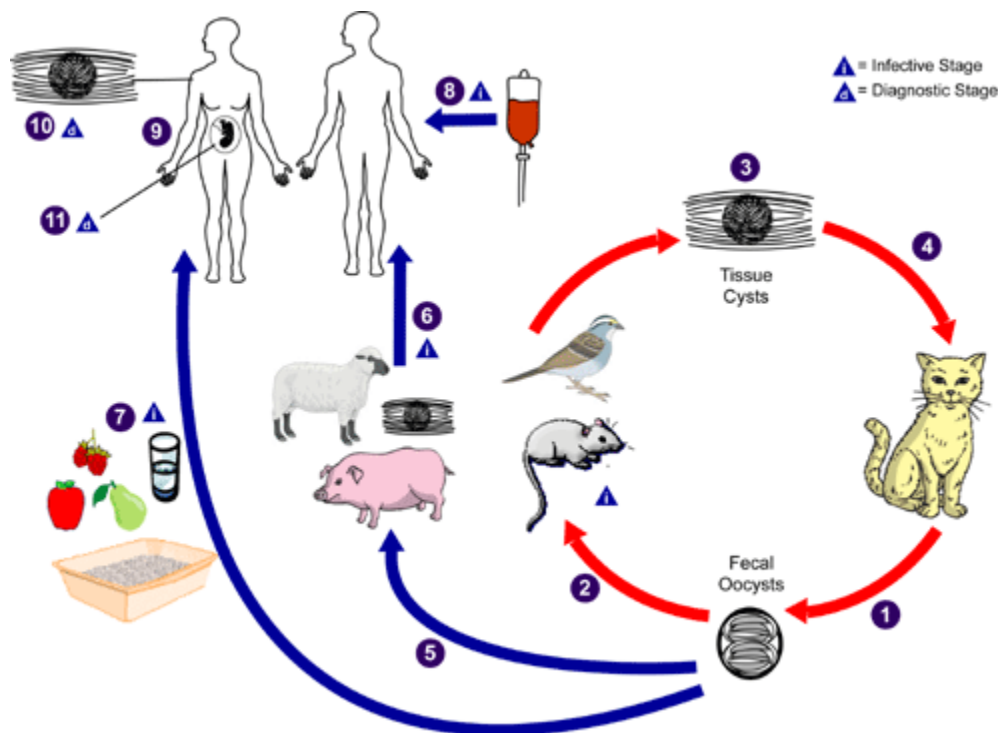


Figura 3. Ciclo de transmissão de *Toxoplasma gondii*. 1- Oocistos não esporulados são eliminados nas fezes do gato e levam de 1 a 5 dias para esporular no ambiente e se tornarem infecciosos. Hospedeiros intermediários (incluindo aves e roedores) se infectam após a ingestão de solo, água ou alimentos contaminados com oocistos. 2- Oocistos se transformam em taquizoítos logo após a ingestão, migram para o tecido neural e muscular e evoluem para cistos contendo bradizoítos. 3- Gatos são infectados após consumir hospedeiros intermediários que hospedam cistos teciduais. 4- Os gatos também podem ser infectados com a ingestão de oocistos esporulados no ambiente. 5- Os seres humanos podem ser infectados por qualquer uma das vias: 6- comer carne crua ou mal cozida de animais que abrigam cistos teciduais, 7- consumir alimentos ou água contaminada com fezes de gatos ou por amostras ambientais contaminadas (como solo contaminado), 8- transfusão sanguínea ou transplante de órgãos e por 9- Via transplacentária de mãe para feto. 10- No hospedeiro humano, os parasitas formam cistos teciduais podendo permanecer durante toda a vida do hospedeiro. O diagnóstico geralmente é realizado por sorologia, embora cistos teciduais possam ser observados em amostras de biópsia coradas. 11- O diagnóstico de infecções congênitas pode ser alcançado pela detecção do DNA de *T. gondii* no líquido amniótico usando métodos moleculares como a PCR.
Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>.

Alguns estudos relatam que a maioria das infecções resulta de consumo de cistos teciduais em carne malcozida ou crua (Muñoz-Zanzi et al., 2010; Torgerson e Macpherson, 2011). Entre os produtos de origem animal, *T. gondii* já foi encontrado encistado em tecidos de bovinos, ovinos, suínos e caprinos (Berger-Schoch et al., 2011; Bezerra et al., 2012).

A água é uma fonte de infecção importante. A contaminação ocorre em reservatórios municipais de água por fezes de felídeos infectados e eliminando oocistos de *T. gondii*. Esta situação pode levar a surtos ou epidemias, envolvendo uma cidade ou até mesmo uma região (Bahia-Oliveira et al., 2003).

A transmissão de *T. gondii* pode ocorrer por transfusão de sangue, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais com material biológico contendo taquizoítos ou bradizoítos (Kawazoe, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004). A transmissão por transfusão sanguínea e transplante de órgãos ocorre quando o doador, em fase aguda, é soropositivo para *T. gondii* e o receptor é soronegativo. Nesses casos, a transmissão ocorrerá quando o receptor estiver com o sistema imunodeprimido. Pode ocorrer também a reativação da infecção em decorrência da imunossupressão (Camargo, 2001).

A fase sexuada e assexuada ocorre nos enterócitos do epitélio intestinal do gato jovem e não imune onde sofrem um processo de multiplicação por endodiogenia (assexuadamente) e merogonia (Dubey e Frenkel, 1972; Silva et al., 2010; Prado et al., 2011). Com a ruptura da célula parasitada, inicia-se à fase sexuada, com a liberação dos merozoítos que invadem novas células epiteliais e se transformam em gametócitos e após a maturação, diferenciam-se em gametas masculinos (microgametas), e femininos (macrogametas). O macrogameta (imóvel) permanece dentro de uma célula epitelial, enquanto os microgametas (móveis e flagelados) saem e fecundam o macrogameta, formando o ovo ou zigoto, que evolui para oocisto (gametogonia), completando o ciclo sexuado (Hill et al., 2005). A célula epitelial sofre rompimento em alguns dias, liberando o oocisto ainda imaturo, esta forma alcança o meio externo, e após a maturação denominada esporogonia apresenta dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (Kawazoe, 2002).

Os felídeos podem eliminar cerca de 100.000 oocistos em cada evacuação, uma vez na vida (Pinto et al., 2009) e, quando reinfectedos desenvolvem imunidade devido a primo-infecção, podendo esta imunidade permanecer até anos em cerca de 55% de gatos (Freyre et al., 1993).

Nos hospedeiros intermediários, ocorre a fase assexuada em diversas células, em que o parasita passa por dois estágios de desenvolvimento, dependendo da fase da infecção aguda ou crônica (Souza et al., 2010).

Os taquizoítos que chegam ao estômago serão destruídos, mas os que penetram na mucosa oral podem evoluir do mesmo modo que os cistos e oocistos (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004). Os oocistos ou cistos teciduais são ingeridos e digeridos, no intestino delgado, se diferenciam em taquizoítos e disseminam pela corrente sanguínea, invadindo células nucleadas. A fase aguda da infecção configura as manifestações clínicas da doença, que nem sempre são presentes devido a maioria dos casos serem assintomáticos. Os taquizoítos após proliferações iniciais se diferenciam em bradizoítos, na parede do vacúolo parasitóforo, que permanecem no interior do cisto caracterizando a fase crônica (Kim e Weiss, 2008; Blader et al., 2015).

Em casos de comprometimento do sistema imunológico, principalmente em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV), pode ocasionar a reativação da doença na qual os cistos latentes podem reativar transformando-se em taquizoítos (Hill e Dubey, 2016).

1.4. Formas clínicas

Dependendo da fonte de infecção, do estado imunológico do paciente e da linhagem da cepa, a toxoplasmose pode resultar em sintomas mais ou menos severos (Dubey et al., 2012).

A toxoplasmose pode ser dividida em quatro formas clínicas: a adquirida, em pacientes imunocompetentes; a doença ocular, consequente da coriorretinite adquirida por via congênita ou adquirida no período pós-natal; a forma congênita e a doença em indivíduos imunocomprometidos (Montoya e Liesenfeld, 2004).

1.4.1. Toxoplasmose em imunocompetentes

Em indivíduos imunocompetentes é assintomática em 80 a 90% dos casos na fase aguda, apresentando evolução benigna (Montoya e Liesenfeld, 2004). É considerada uma doença autolimitada em indivíduos saudáveis, sendo o tratamento considerado desnecessário, uma vez que muitos pacientes não desenvolvem complicações mais severas.

Nos pacientes sintomáticos, cerca de 10–20%, na fase aguda da infecção, podem ser observadas manifestações clínicas brandas e inespecíficas como febre, mal-estar, mialgia, dor de garganta e cefaleias (Montoya e Remington, 1995; Remington et al., 2006).

Os sintomas estão relacionados com a virulência da cepa e com o sistema imune do hospedeiro, uma vez que o sistema imunológico pode não conseguir conter a infecção (Bushrod, 2004; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Certas manifestações clínicas, embora com menor frequência, caracterizam um quadro mais grave da infecção adquirida, podendo ser afetados órgãos como o coração, os músculos-esqueléticos, o fígado e os pulmões (Beaman et al., 1995; Mitsuka-Breganó et al., 2010).

1.4.2. Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular pode ser de origem congênita ou adquirida, sendo que a forma congênita pode ocorrer no período neonatal ou pós-natal e na adquirida a lesão pode ser concomitante com a infecção sistêmica ou os sintomas são de forma tardia (Montoya e Liesenfeld, 2004).

T. gondii é responsável pela maioria dos casos de uveítes infecciosas, que são inflamações que podem acometer a retina e o nervo óptico. A lesão mais frequente de uveíte posterior é a retinocoroidite (Figura 4), que pode deixar sequelas graves, incluindo a perda completa da visão (Bonfioli e Orefice, 2005).

Alguns sintomas incluem diminuição da visão pelo edema, inflamação ou necrose da retina, opacidades no campo visual, dor, fotofobia, catarata e glaucoma. Em pacientes imunocompetentes a toxoplasmose ocular é responsável por cerca de 30 a 50% dos casos (Villard et al., 2003).



Figura 4. Retinocoroidite causada pela toxoplasmose. Fonte: Caiaffa *et al.* 1993.

1.4.3. Toxoplasmose gestacional e congênita

A transmissão vertical ocorre quando a gestante não imune adquire a primo-infecção durante a gravidez, o parasita na forma de taquizoíto consegue atravessar a barreira placentária (Remington e Klein, 1995). Durante a progressão da gravidez, a permeabilidade da placenta vai-se alterando e, à medida que a gestação avança, torna-se mais permeável à passagem do parasita para o feto (Souza, 2002).

A frequência da transmissão congênita varia de acordo com o período gestacional em que a mãe foi infectada. Infecções adquiridas dentro das primeiras semanas de gestação apresentam uma taxa menor de transmissão vertical (Montoya e Liesenfeld, 2004).

No primeiro trimestre o feto pode ser acometido com lesões oculares e neurológicas graves, sendo que em alguns casos, crianças infectadas podem desenvolver sintomas mais tardiamente. O risco de infecção do feto

aumenta com o período gestacional, ao passo que a gravidade das sequelas diminui à medida que este período aumenta (Kravetz e Federman, 2005).

Essa patologia pode causar uma variedade de manifestações clínicas na criança, como hidrocefalia, microcefalia, calcificações cerebrais, coriorretinite, cegueira, epilepsia, retardo motor, retardo mental, anemia e convulsões. Destas, a doença ocular é a seqüela mais comum e a hidrocefalia a mais rara (Desmonts e Couvreur, 1974; Remington e Klein, 1995; Kravetz e Federman, 2005).

Se a infecção é adquirida no terceiro trimestre de gestação poderão ocorrer infecções subclínicas no feto ou ausência de doença (Desmonts e Couvreur, 1974; Remington e Klein, 1995). Sequelas de atraso neurológico, desenvolvimento psicomotor retardado e surdez neurosensorial, também têm sido demonstrados em crianças que foram infectadas na gestação, mesmo entre aquelas com infecção subclínica durante o período neonatal (Dukes et al., 1997, Brown et al., 2005).

Em mulheres que já apresentam soropositividade antes da gravidez dificilmente o feto será infectado (Kravetz e Federman, 2005). Entretanto, mulheres imunocomprometidas previamente infectadas podem transmitir a infecção para seus fetos (Wechsler et al., 1986), mas poucos casos são descritos na literatura (Remington et al., 2006). Em crianças nascidas de mães soropositivas para o HIV a possibilidade de transmissão é de 5% (Prado et al., 2011).

A infecção congênita pode permanecer latente por um longo período, podendo ser reativada durante a puberdade, pela influência hormonal, ou mesmo na vida adulta (Amato e Marchi, 2002; Remington et al., 2006).

1.4.4. Toxoplasmose adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos.

Os indivíduos imunocomprometidos (transplantados, pacientes com doenças linfoproliferativas e pacientes com deficiência na imunidade celular

como os portadores do HIV) são seriamente afetados pela doença, podendo ter a toxoplasmose adquirida ou reativada (Montoya e Liesenfeld, 2004; Dunay et al., 2018).

A toxoplasmose cerebral ocorre principalmente com a reativação da infecção latente, produzindo ruptura dos cistos e proliferação dos taquizoítos, devido à imunidade baixa (Yenilmez e Çetinkaya, 2019). Isso ocorre quando a imunodepressão celular é intensa, cuja contagem de linfócitos T CD4⁺ comumente é menor que 100 células/mm³, podendo ocorrer à toxoplasmose cerebral como primeira manifestação da aids (Hernández-González et al., 2002; Jones et al., 2014; Yenilmez e Çetinkaya, 2019).

A encefalite toxoplasmática (TE) é uma das infecções mais comuns do sistema nervoso central (SNC), sendo a toxoplasmose cerebral a causa de óbito com muita frequência em pacientes com aids (Pereira-Chioccola et al., 2009; Connolly et al., 2017).

A TE é caracterizada como um processo subagudo inicialmente, e os sintomas evoluem gradualmente ao longo de várias semanas. As manifestações clínicas são variáveis e podem incluir cefalalgia, convulsões focais, afasia, apraxia, hemiparesia e déficits neurológicos focais progressivos (Bowen et al., 2016; Ruiz, 2016).

Além do comprometimento do SNC, esses pacientes também podem apresentar coriorretinite, pneumonite, miocardite, bem como doença disseminada (Montoya e Liesenfeld, 2004; Remington et al., 2006). As manifestações clínicas dependem principalmente da topografia e número de lesões (Vidal, 2019).

O tratamento da TE com terapia antitoxoplasma inclui uma fase de indução que atua principalmente contra os taquizoítos para tratar os sintomas e sinais agudos, seguida de uma fase de manutenção para evitar a reativação da infecção (Albarillo e O'Keefe, 2016). Na ausência de tratamento, a progressão de anormalidades neurológicas pode ser fatal (Vidal, 2019).

1.5. Epidemiologia da toxoplasmose

Avaliações epidemiológicas mostram que a toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, com incidência variável em todos os continentes, nos mais variados climas, com importantes repercussões na saúde pública, sobretudo quando envolve o contexto de doença congênita ou de patologia em imunocomprometidos (Amendoeira et al., 1999; Ministério da Saúde, 2010; Coura, 2013). Afeta cerca de um terço da população mundial, acometendo aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo (Montoya e Liesenfeld, 2004; Pappas et al., 2009; Pereira-Chiocola et al., 2009; Borges et al., 2017).

De acordo com Frenkel et al. (1995), o índice de infecção em uma população humana depende da combinação de padrões de vida e de cultura. Os índices de soropositividade variam entre os países e, muitas vezes, dentro de um dado país ou entre diferentes comunidades da mesma região (Pappas et al., 2009).

Diversos fatores são responsáveis pela variabilidade da frequência dessa infecção como fatores climáticos, socioeconômicos, culturais, região geográfica e hábitos alimentares (Tenter et al., 2000; Fialho et al., 2009). Outro fator correlacionado a prevalência de toxoplasmose é a idade da população, o que indica que a infecção é adquirida ao longo da vida (Remington et al., 2006).

A infecção por *T. gondii* é amplamente prevalente tanto em humanos quanto em animais, tendo sido observada elevada taxa de ocorrência clínica em seres humanos. É estimado que cerca de 20 a 90% da população mundial humana adulta esteja infectada, dependendo da região que se analisa, sendo que na maioria dos casos a infecção é assintomática (Hill et al., 2005; Torgerson e Macpherson, 2011).

Na América Central, América do Sul e Europa estima-se que entre 30 e 90% da população esteja infectada. Enquanto que nos Estados Unidos este percentual varia entre 8 e 22% (Hill e Dubey, 2016), a Austrália, Polônia, Reino Unido e Bélgica mostram prevalência média (entre 23 e 53%), e o Taiti e

França apresentam alta prevalência (> 60%) (Avelino et al., 2003), conforme podemos observar na figura 5.

A soroprevalência em humanos é alta no Brasil, chegando a 90% em algumas regiões, e pode estar relacionada à alta contaminação ambiental por oocistos (Dubey et al., 2010; Silva et al., 2017). Em crianças e gestantes a soroprevalência no Brasil é uma das mais altas mundialmente (Tenter et al., 2000; Dubey, 2010b). Até 50% das crianças de 6 a 8 anos de idade, em algumas áreas do Brasil, têm anticorpos contra *T. gondii* associados à ingestão de oocistos (Bahia-Oliveira et al., 2003; Dubey et al., 2012).

Os felídeos são considerados como os animais mais importantes na epidemiologia da toxoplasmose devido à eliminação de oocistos no meio ambiente. O potencial de contaminação de produtos com oocistos é alto devido aos níveis de contaminação de oocistos nas águas superficiais, especialmente quando estas são usadas para fins de irrigação (Hill e Dubey, 2016).

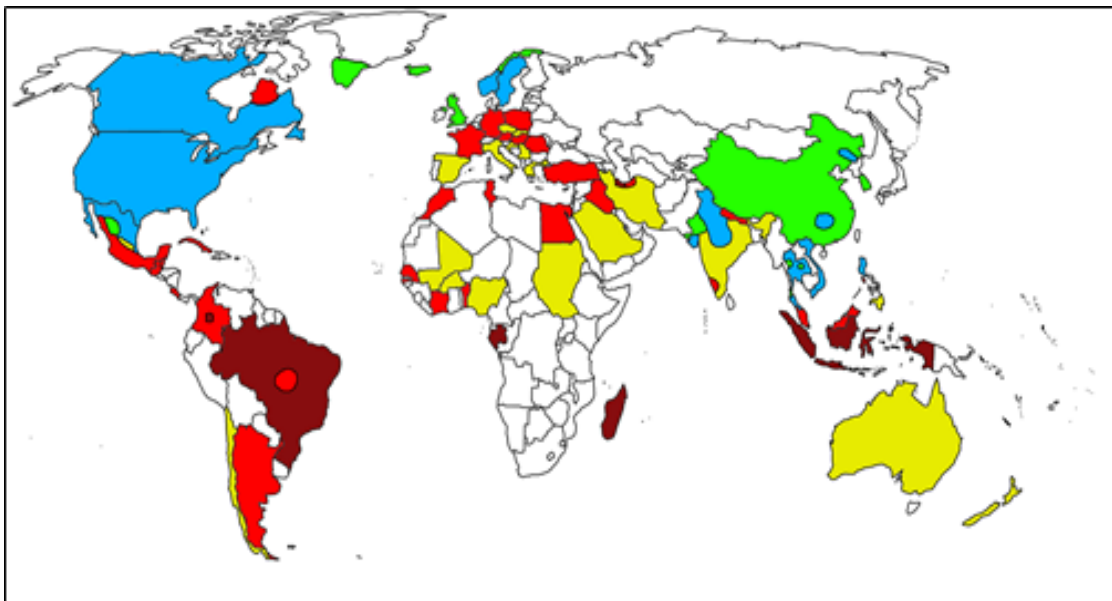


Figura 5. Mapa ilustrando a situação Global da soroprevalência de *Toxoplasma gondii*. Em vermelho escuro a prevalência é igual ou acima de 60%, vermelha é de 40-60%, amarelo de 20-40%, azul de 10-20% e verde prevalência menor que 10%. Branco é igual a ausência de dados. Fonte: Pappas et al., 2009.

1.5.1. Epidemiologia da toxoplasmose cerebral e aids

Antes da pandemia da aids, a toxoplasmose cerebral era uma rara complicação que acometia pacientes imunocomprometidos e transplantados (Harrison e McArthur, 1995). Estima-se que a toxoplasmose cerebral seja um evento definidor de aids em 75% dos casos (Vidal et al., 2005).

Entre 2000 e 2010 foram identificadas 789 mortes por toxoplasmose nos EUA, das quais 271 foram causadas por encefalite toxoplásmica (Cummings et al., 2014). A taxa de prevalência nos EUA e no Reino Unido variou entre 16 e 40%, na Espanha foi de aproximadamente 60% e na França de 75-90% (Colina e Dubey, 2002; Bahia-Oliveira et al., 2003).

Até 2016 mais de 75 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV, sendo que 36 milhões deles foram à óbito; e ocorreram nestes anos cerca de 2 milhões de novas infecções (Mayer et al., 2016; Dabis e Bekker 2017). Estima-se que 1,8 milhões de pessoas vivem com HIV na América Latina, sendo que no Brasil tem mais de um terço dos casos. Contudo, a prevalência do HIV é maior em países como Guatemala, Honduras e Belize (Dourado et al., 2006).

No Brasil, no período de 1980 a 2018 foram identificados 926.742 casos de aids, com registro anual em média de 40 mil novos casos nos últimos cinco anos. O número anual de casos vem diminuindo, em um período de dez anos, a taxa de detecção apresentou queda de 9,4%. Em 2007 foram 20,2 casos/100 mil habitantes e, em 2017, 18,3 casos/100 mil habitantes. Desde o início da epidemia até 31 de dezembro de 2017 foram notificados 327.655 óbitos tendo o HIV/aids como causa básica. A maior proporção desses óbitos ocorreu na região Sudeste com 58,9% dos casos (Ministério da Saúde, 2018).

A introdução da terapia antirretroviral (TARV) reduziu significativamente a incidência e a mortalidade associada a infecções oportunistas, incluindo a toxoplasmose (Sacktor, 2001; Abgrall et al., 2001; Jones et al., 2002).

A prevalência e as taxas de casos fatais de toxoplasmose cerebral também reduziram em pacientes infectados pelo HIV tanto de países

desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Antinori et al., 2004, Vidal e Oliveira, 2013). A proporção de mortes associadas à doença diminuiu de 3,5% de todas as mortes por HIV entre 1992–1998, sendo uma redução maior do que em mortes relacionadas ao HIV em geral (Jones et al., 2002).

No Brasil, as elevadas taxas de incidência de toxoplasmose cerebral são resultado da alta infecção por toxoplasmose no país (Coelho et al., 2014). A introdução de TARV contribuiu para o declínio da incidência da toxoplasmose cerebral (Vidal e Oliveira, 2013).

Apesar do acesso universal e gratuito da TARV e diminuição dos casos, a toxoplasmose cerebral ainda é responsável por alta morbidade e mortalidade, sendo a terceira condição mais frequente associada a aids no Brasil (Vidal e Oliveira, 2013; Pellegrino et al., 2019). A probabilidade de a toxoplasmose ser reativada é em até 30% dos casos que não recebem profilaxia da TARV ou com a descontinuação do tratamento (Grant et al., 1990; Abgrall et al., 2001).

Os casos de toxoplasmose diminuíram nos primeiros anos da TARV no Estado de São Paulo, mas aumentaram nos últimos anos, confirmando a persistência do diagnóstico tardio do HIV, a não adesão e/ou falha da TARV em pacientes infectados pelo HIV (Vidal e Oliveira, 2013).

Atualmente, a toxoplasmose cerebral ainda representa um determinante de mau prognóstico em pacientes com doença avançada e imunodeficiência grave. O diagnóstico precoce e o tratamento imediato no início da toxoplasmose cerebral reduzem o risco de sequelas neurológicas e a mortalidade (Antinori et al., 2004; Vidal et al., 2005; Hernandez et al., 2017, Vidal, 2019).

1.6. Diagnóstico da toxoplasmose

Os métodos tradicionais de detecção direta do parasita são dificilmente realizáveis, pois, demandam certo tempo e apresentam baixa sensibilidade (Rey, 2001). O diagnóstico indireto é feito por métodos

sorológicos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), dentre outros (Cristo et al., 2005).

Os exames sorológicos são os mais comumente utilizados no diagnóstico da toxoplasmose. No entanto, algumas desvantagens são observadas na RIFI tais como, a subjetividade na interpretação da fluorescência e possíveis resultados falso-positivos. Ambos os testes sorológicos apresentam boa especificidade e sensibilidade na fase aguda (pesquisa de anticorpos IgM) e crônica (pesquisa de anticorpo IgG) (Montoya e Lisenfeld, 2004). Contudo, a elevada prevalência de anticorpos IgG e a persistência de anticorpos IgM por longos períodos tem complicado a interpretação dos testes sorológicos quando há suspeita de toxoplasmose aguda (Nascimento et al., 2008).

O teste ELISA-avidez de IgG é um método altamente sensível para a identificação de infecção primária aguda por *T. gondii* (Jenum et al., 1998). Os resultados são baseados na medida da avidez ou afinidade funcional dos anticorpos da classe IgG específicos para o *T. gondii*. Mulheres com resultados de testes de alta avidez foram infectadas por pelo menos 3 a 5 meses. Como os anticorpos de baixa avidez podem persistir por muitos meses, sua presença não indica necessariamente infecção adquirida recentemente (Montoya et al., 2002).

Apesar de as técnicas sorológicas alcançarem bons índices de sensibilidade e especificidade, recomenda-se a associação destas técnicas com a PCR. Os métodos moleculares são importantes ferramentas para complementar o diagnóstico da toxoplasmose, principalmente em pacientes com toxoplasmose cerebral/aids e gestantes. Os métodos moleculares são capazes de amplificar fragmentos específicos de DNA do parasita em todos os fluidos corporais em que o parasita possa se instalar, como sangue periférico, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano (LCR), humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar, dentre outros. Assim, a PCR constitui uma importante ferramenta para o diagnóstico por ser um método rápido, sensível e específico, evitando a necessidade de procedimentos mais invasivos, como

as biópsias (Jenum et al., 1998; Vidal et al., 2004; Colombo et al., 2005; Pereira-Chiocola et al. 2009; Vidal et al., 2011; Camilo et al., 2017).

1.6.1 Diagnóstico da toxoplasmose cerebral

O diagnóstico definitivo da toxoplasmose cerebral necessita de demonstração direta do parasita em amostras cerebrais (Dupon et al., 1995; Joseph et al., 2002). O diagnóstico presuntivo se baseia em resultados positivos nos testes sorológicos com a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, sinais clínicos e a presença de lesões sugestivas no cérebro, detectadas por tomografia computadorizada ou ressonância magnética, como mostra a figura 6 (Cohen et al., 1999; Vidal et al., 2004).

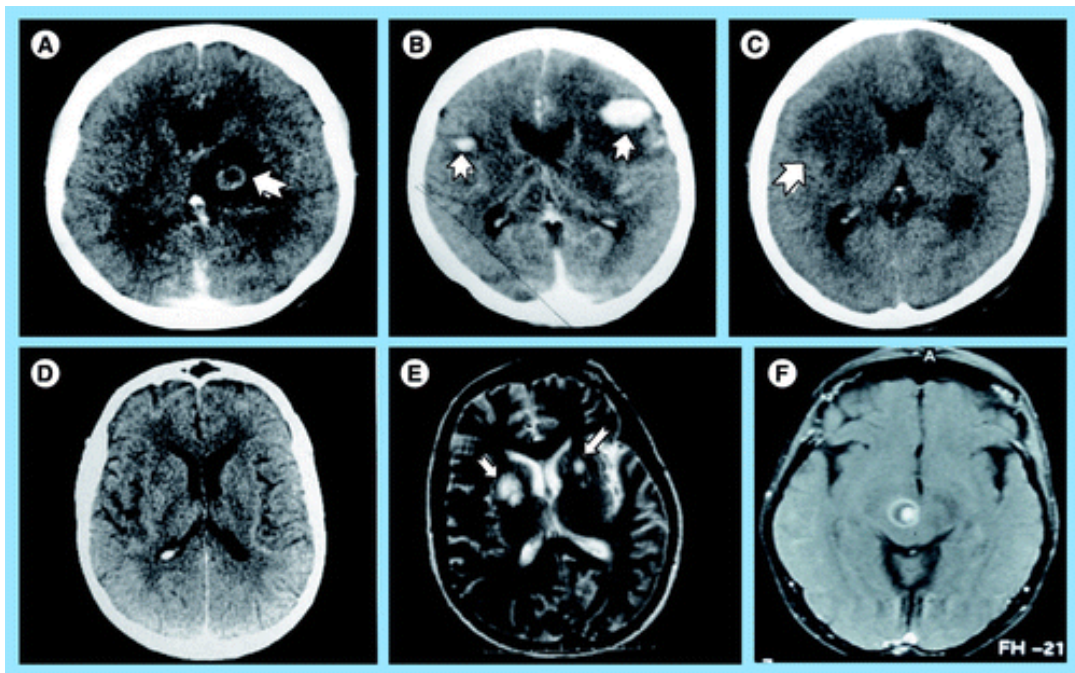


Figura 6. Imagens de tomografia computadorizada de pacientes com toxoplasmose cerebral com contraste/ressonância magnética. As setas mostram as anormalidades. Lesões expansivas com realce anelar (A); com realce nodular (B); sem realce após injeção do contraste (C); a tomografia computadorizada com realce pelo contraste não mostrou anormalidades (D) lesões focais com sinais de alta intensidade (E) nódulo assimétrico aprimorado ao longo da parede da lesão (F). Fonte: Pereira-Chiocola et al., 2009.

Contudo, o diagnóstico da toxoplasmose cerebral quando baseado em imagens, pode ser confundido com outras patologias. Diante disso, deve ser acompanhada a evolução tanto do ponto de vista clínico como radiológico após a administração da terapia específica (Alonso et al., 2002).

A introdução das técnicas de imagens e as moleculares tornaram a avaliação inicial das lesões focais nos pacientes com aids menos invasiva, pois, diminuíram o número de biópsias (Ammassari et al., 2000; Skiest, 2002; Vidal et al., 2004).

Diversos trabalhos têm relatado a utilização da PCR na confirmação diagnóstica da toxoplasmose cerebral, pela detecção de DNA de *T. gondii* em amostras biológicas, como sangue e LCR. Entretanto, a PCR em amostras de LCR apresenta importante limitação devido à coleta ser invasiva e contraindicada em pacientes com lesões cerebrais expansivas (Cohen, 1999; Pereira- Chioccola et al., 2009).

Já a PCR em amostras de sangue, além de a coleta ser menos invasiva, tem sido empregada com sensibilidade variando entre 16–86% (Bastien, 2002; Priya et al., 2002; Bretagne, 2003; Colombo et al., 2005). Contudo, para a realização da técnica devem ser estabelecidos alguns critérios rígidos, como a escolha dos marcadores moleculares, o processamento das amostras e a forma e o tempo de coleta que devem ser antes ou nos primeiros dias após a introdução do tratamento específico (Bretagne, 2003; Vidal et al., 2004; Colombo et al., 2005).

1.7. A resposta imune do hospedeiro

A resposta imune na toxoplasmose varia consideravelmente dependendo da apresentação clínica da doença e depende fortemente do *status* imune do hospedeiro (Suzuki e Remington, 1993; Munoz et al., 2011).

T. gondii é um parasita intracelular obrigatório que induz uma potente resposta imune que é consistente e duradoura buscando o controle da proliferação dos taquizoítos. A resposta imune contra *T. gondii* é mediada por

mecanismos da imunidade celular, inata e humoral, sendo o primeiro um fator determinante de resistência contra a infecção (Kahi et al., 1998; Blader e Saeij, 2009; Munoz et al., 2011).

Após a ingestão de oocistos esporulados ou de cistos contendo bradizoítos, os parasitas são liberados no intestino delgado e invadem os enterócitos, onde se diferenciam em taquizoítos (Mennechet et al., 2002). As células imunes inatas, como as células dendríticas (DCs), macrófagos e neutrófilos detectam o parasita, principalmente por meio de receptores Toll-like (TLRs), e secretam IL-12, para estimular células T CD4⁺ e CD8⁺ e células natural killer (NK) a produzirem IFN- γ (Wang, Jin-Lei et al., 2019).

IL-12 e IFN- γ são citocinas importantes para a morte dos parasitas durante infecção aguda e também são essenciais para a manutenção da infecção crônica (Pittman e Knoll, 2015). No entanto, a produção de IL-12 precisa ser controlada para prevenir uma patologia pró-inflamatória (Denkers, 2010).

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória responsável por minimizar os danos causados por uma resposta imune inflamatória exacerbada regulando a produção de IL-12 e conseqüentemente diminuindo a quantidade de IFN- γ (Pittman e Knoll, 2015; Wang, Jin-Lei et al., 2019).

O início da resposta imune adaptativa é essencial para desencadear a fase crônica. A imunidade adaptativa depende em grande parte das células apresentadoras de antígenos (APCs) para ativar as células B nos órgãos linfóides secundários. As células B podem atuar como APCs para estimular as células T CD4⁺ e secretam citocinas como IFN- γ e IL-12 (Harris et al, 2005). As células T CD4⁺ e CD8⁺ agem sinergicamente para impedir a reativação de cistos, o que é considerado necessário para o controle da infecção crônica (Hwang e Khan, 2015; Pittman e Knoll, 2015; Wang, Jin-Lei et al., 2019).

A resposta imune humoral contra *T. gondii* se desenvolve durante a parasitemia na infecção aguda e é direcionada principalmente contra os taquizoítos. A imunidade humoral exerce efeitos protetores como a

opsonização dos parasitas por fagocitose; inibir a ligação do parasita às células hospedeiras e o bloqueio da invasão parasitária (Sayles et al., 2000).

1.8. microRNAs (miRNAs)

Nos últimos anos foram descobertas novas moléculas que desempenham papéis importantes na regulação gênica. Os miRNAs constituem uma família de pequenos RNAs não codificadores de proteínas, em média de 22 nucleotídeos, que regulam a expressão de milhares de genes vinculando e reprimindo a atividade do RNA mensageiro (mRNAs) alvo específico (Bartel, 2004).

O primeiro miRNA, *lin-4*, foi descrito por Lee et al. (1993), que verificaram que esse gene responsável pela regulação do desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans*, não codificava nenhuma proteína, e sim um par de pequenos RNAs que inibiam a proteína *lin-14*. Sete anos depois, outro grupo identificou um novo miRNA, também em *C. elegans*, denominado de *let-7*. Esse novo miRNA tinha a mesma característica de se parear à região 3'UTR, mas de outro gene, o *lin-41*, e inibir sua tradução durante a passagem do estágio larval L4 para adulto (Reinhart et al., 2000).

A sequência do *let-7* mostrou-se ser altamente conservada entre diferentes espécies (Reinhart et al., 2000), o que evidenciava a não exclusividade dos miRNAs aos nematóides. Outros estudos reconheceram os miRNAs como uma classe distinta de reguladores biológicos sendo encontrados em insetos, mamíferos e plantas (Lagos-Quintana, 2001; He e Hannon, 2004).

A partir desses achados, surge um novo campo de estudo onde muitos miRNAs foram descritos atuando em vários processos biológicos (He e Hannon, 2004). Atualmente, o banco de dados de miRNAs registra mais de 38.589 sequências descritas em organismos vertebrados, invertebrados, plantas e vírus (<http://www.mirbase.org/>).

1.8.1. Biogênese de miRNAs

Os genes que contém os miRNAs são evolutivamente conservados e podem se originar de íntros ou éxons de gene codificadores de proteínas ou em regiões intergênicas (Rodriguez et al., 2004).

São formados a partir de longos transcritos primários, em geral, pela RNA polimerase II, gerando o miRNA primário (pri-miRNA) com algumas centenas de nucleotídeos (Lee e Ambros, 2001 e Kim et al., 2009) no núcleo. No entanto, em alguns casos, a transcrição de miRNA pode ser realizada por RNA polimerase III (Borchert, 2006).

As estruturas geradas contêm regiões em que os nucleotídeos se pareiam e as regiões não pareadas formam alças (Amaral et al., 2010). Após a transcrição, os pri-miRNAs são processados por uma RNase III chamada Drosha, que quebra os locais de pareamento do pri-miRNA, liberando uma estrutura similar a um grampo de cabelo denominado miRNA precursora (pré-miRNA), que possui aproximadamente 70 nucleotídeos (Gregory e Shiekhattar, 2005).

Após este processamento, proteínas relacionadas com o transporte nuclear, como a exportina 5-Ran-GTP, exportam os pré-miRNAs para o citoplasma (Lee e Ambros, 2001). Em seguida, a alça (região não pareada) é removida pela enzima Dicer, outra endonuclease de RNase III (Song e Rossi, 2017), formando somente um duplex de RNA com 22 pares de nucleotídeos contendo as seqüências maduras de miRNA que são subsequentemente carregadas no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC – *RNA Induced Silencing Complex*) (Slota e Booth, 2019).

O RISC é constituído por enzimas e proteínas Argonautas (Ago), a principal proteína desse complexo de silenciamento (Valencia-Sanchez et al., 2006), que promove o desnovelamento e a quebra das pontes de hidrogênio que unem as duas fitas, permanecendo o miRNA maduro associado a Ago e a outra fita é degradada (Gregory e Shiekhattar, 2005; Vargas e Stolf-Moreira, 2013) (Figura 7).

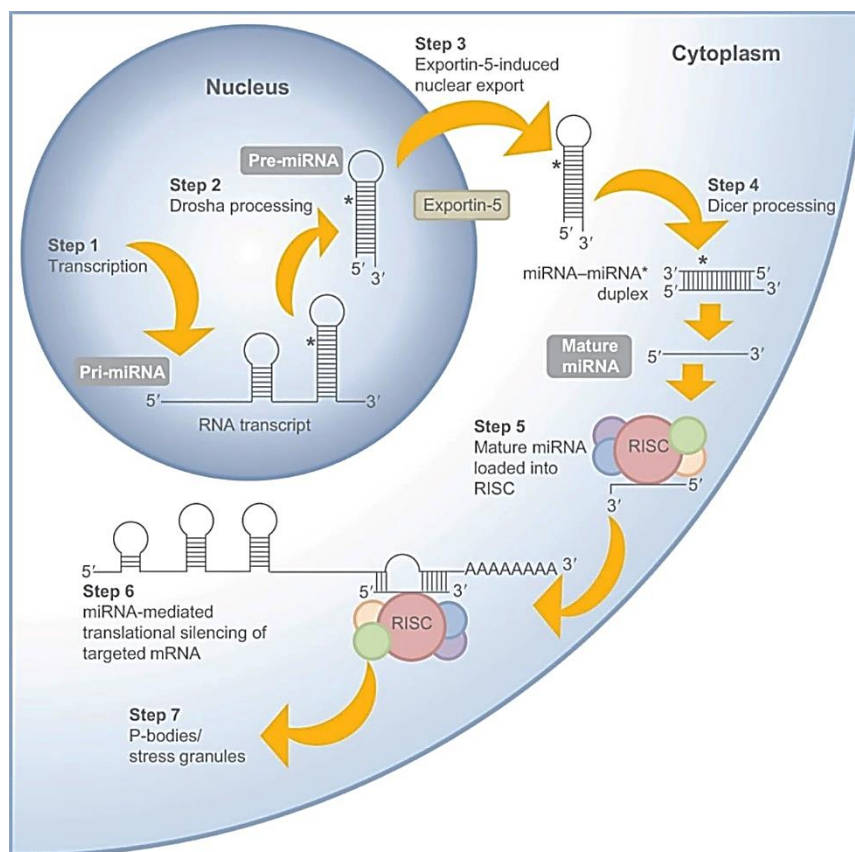


Figura 7. Processo de biogênese do miRNA. Os miRNAs são inicialmente transcritos como pri-miRNA(1) que são processados em pré-miRNA dentro do núcleo (2). Os pré-miRNA são exportados para o citoplasma (3), onde são processados em miRNA maduro (4) e carregados no complexo de silenciamento induzido por RNA- RISC (5). Os miRNAs maduros guiam o RISC para direcionar os transcritos de mRNA selecionados para silenciamento ou degradação (6 e 7).

Fonte: Biggar e Storey, 2015.

1.8.2. Mecanismo de ação de miRNAs

A escolha do mecanismo de silenciamento gênico mediado por miRNAs pode ser determinada pelo grau de complementariedade e homologia deles com seus mRNAs-alvos (Gregory e Shiekhattar, 2005).

Existem dois mecanismos distintos no qual os miRNAs podem ligar-se ao mRNA alvo regulando a expressão gênica: através da degradação ou repressão da tradução do mRNA alvo. O bloqueio traducional do mRNA ocorre pelo incompleto pareamento de bases e a degradação por

exonucleases acontece quando a complementaridade é completa ou quase completa. O mecanismo de clivagem do mRNA pode ser irreversível, diferentemente do bloqueio traducional (Wu et al., 2006, Cowland et al., 2007).

Cada miRNA pode apresentar vários mRNA alvos e alguns mRNA necessitam de vários miRNA para a inibição. Supõe-se que 60% dos mRNA de humanos sejam regulados por miRNAs (Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005; Friedman et al., 2009).

Os miRNAs estão sujeitos a regulação em vários níveis, incluindo o nível de transcrição e em cada uma das etapas de sua biogênese (Ha e Kim, 2014). Eles também podem ser liberados das células em pequenas vesículas extracelulares, como os exossomos, permitindo que os miRNAs participem da comunicação intercelular (Bayraktar et al., 2017).

Como regulam a expressão gênica, os miRNAs são fundamentais para diversas funções celulares de eucariotos como proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, interação entre vírus e célula hospedeira, metabolismo, conformação cromossômica, oncogênese entre outros. Desta forma, a sub ou superexpressão de um miRNA pode acarretar grandes disfunções celulares, consequentemente teciduais e sistêmicas (Vargas e Stolf-Moreira, 2013).

1.8.3. Potencial aplicação dos miRNAs

Estudos recentes indicaram que os miRNAs circulam na corrente sanguínea e que a abundância específica de alguns, no plasma ou no soro, podem servir como biomarcadores de câncer e outras doenças (Evan et al., 2010).

O biomarcador ideal além das evidências científicas que confirmam que seu uso influencia o diagnóstico ou desfecho da doença deve ter boas características de desempenho, como sensibilidade, especificidade e poder preditivo. Além disso, deve ser seguro, fácil de medir e rentável (Parikh e Vasan, 2007).

Como a expressão dos miRNAs apresenta-se significativamente alterada, comparativamente com o perfil de expressão normal em patologias, eles ganharam destaque pelo seu potencial uso como biomarcadores (Mohr e Mott, 2015). A sua utilização como biomarcador é especialmente relevante em doenças nas quais os sinais aparecem numa fase mais tardia e/ou avançada ou onde o diagnóstico envolve a realização de técnicas invasivas para os doentes (Almeida et al., 2011).

O perfil de expressão é específico de tecido ou, por vezes, específico de um tipo de célula, e alguns miRNAs são específicos de fases de desenvolvimento (Dwivedi, 2014). Sendo assim, há um potencial para identificar esses padrões específicos de doença como parte de uma estratégia para diagnóstico, prognóstico e intervenções terapêuticas (Bhatt, 2016).

Dado o papel central dos miRNAs na regulação de cascatas de sinalização durante a saúde e a doença, eles podem servir como base para importantes alvos terapêuticos (Pereira et al., 2017). Terapias baseadas em miRNA têm sido propostas em muitos transtornos complexos, tendo em vista que essas moléculas geralmente atuam suprimindo a reparação do DNA ou aumentando a tolerância ao dano do DNA (Majidinia e Yousefi, 2016).

O pré-requisito para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas baseadas em miRNA extracelulares é a capacidade de serem medidos com sensibilidade e precisão para se tornarem clinicamente eficazes. Esses requisitos podem ser atendidos por métodos quantitativos como a PCR em tempo real (qPCR) (Evan et al., 2010).

1.8.4. Funções dos miRNAs

Desde que foi descoberto, os miRNAs demonstraram desempenhar papéis em diversas doenças, incluindo câncer, doenças inflamatórias, diabetes e obesidade (Friedman e Jones, 2009; Arner e Kulyte, 2015; Deiuliis, 2016). Além de processos vitais, estão implicados em diversas atividades celulares, como resposta imune, secreção de insulina, síntese de

neurotransmissores, ritmo circadiano e, replicação viral (Poy et al., 2004; Jopling et al., 2005; Gantier et al., 2007; Greco e Rameshwar, 2007; Cheng et al., 2007).

Dentre os miRNAs relacionados à infecção por *T. gondii*, o miR-155 e miR-146a parecem promissores e foram fortemente induzidos pelo parasita no cérebro de camundongos infectados (Canella et al., 2014). O miR-155 tem sido alvo de muitos estudos em diversos campos de pesquisa. Este miRNA já é descrito por atuar em vias de sinalização para diferenciação da resposta celular do tipo Th1, tendo sua deficiência implicada na diminuição da resposta imune celular e humoral dependente de célula T (Rodriguez et al., 2007; Thai et al., 2007; Oertli et al., 2011).

Rodriguez et al. (2007) e Amado et al. (2015) mostraram o papel do miR-155 na regulação negativa da diferenciação da resposta celular do tipo 2 (Th2). Tanto em humanos como em camundongos, o miR-155 é altamente expresso em subpopulações de células Th17 e, em modelo murino (C57BL/6) de infecção por *T. gondii*, é requerido para expressão de citocinas por células T reguladoras (T_{reg}) e células Th17 (Escobar et al., 2014).

Em contrapartida, o miR-146a tem sido implicado na supressão da diferenciação das células Th17 (Yang et al., 2012; Zhu et al., 2014; Wang et al., 2014). Dada a sua importância, este miRNA altamente expresso em células T_{reg} parece ser vital para o controle da resposta imune Th1 mediada por IFN- γ (Lu et al., 2010). Além disso, sua expressão tem sido associada com o fenótipo de memória de superfície em células T CD8⁺ ex vivo e culturas in vitro (Sheppard et al., 2014).

O miR-21 é abundantemente expresso em células de mamíferos e evolutivamente conservado em uma ampla gama de espécies de vertebrados (Li et al., 2018). Atua como um regulador negativo do TLR 4 e inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Sheedy et al., 2010). Alguns estudos mostraram que o nível de expressão de miR-21 foi elevado em vários tecidos de câncer, incluindo tecidos retais, gástricos e pulmonares (Lopes-Ramos et al., 2014; Park et al., 2016) sendo também significativamente suprarregulado em fígados infectados por *T. gondii* (Cong et al., 2017). Esse miRNA

desempenha um papel na biologia tumoral e durante todos os outros estágios da carcinogênese (Li et al., 2018).

O miR-125b, pertencente à família miR-125, tem sido relatado como implicado no desenvolvimento de doenças inflamatórias, bem como na diferenciação de células T (Wei e Pei, 2010). Além disso, sua expressão foi relatada em desenvolvimento e função de células imunes, promoção ou supressão do câncer em diferentes tipos de células, sensibilidade ou resistência a drogas quimioterápicas, e potenciais clínicos em terapias e tratamentos contra o câncer (Wang, Jessica et al., 2019). É importante ressaltar que o miR-125b também foi encontrado regulado negativamente após a infecção com a linhagem RH, indicando que macrófagos infectados com diferentes genótipos de *T. gondii* apresentam diferentes perfis de expressão deste miRNA (Li et al., 2019).

A família miR-29 consiste em miR-29a, b e c, distribuídos em dois cromossomos, 1q32 e 7q32 (Jiang et al., 2014). O miR-29c está bem estabelecido como um supressor de tumor em muitos tipos de câncer, incluindo o pulmão, o pâncreas e a bexiga (Wang et al., 2013; Jiang et al., 2015; Zhao et al., 2015). Desempenha um papel crucial na condução da miogênese, aumentando a massa muscular e inibindo a atrofia e fibrose muscular, portanto, este miRNA pode ser útil como uma ferramenta terapêutica para regular essas funções em condições patológicas (Falcone et al., 2019). O miR-29c foi descrito como um dos reguladores da neurogliogênese na retina, uma vez que os seus alvos são genes regulatórios conservados na retina, uma parte integrante do SNC, ele pode desempenhar um papel similar durante a neurogliogênese, em outras partes do cérebro (Xia et al., 2019).

Muitos miRNAs são comumente alterados durante um espectro de muitos tipos diferentes de doenças. Portanto, padrões de múltiplos miRNAs que são especificamente alterados durante o estado de doença devem ser identificados, a fim de distinguir patologias específicas com base na expressão de miRNA (Slota e Booth, 2019).

1.9. Análise da Expressão Gênica

O termo expressão gênica pode ser descrito como o conjunto de processos pelo qual a informação contida em um gene é decodificada em proteínas. Nos microrganismos o controle da expressão gênica serve principalmente para permitir que o seu crescimento e divisão sejam potencializados e, no caso dos microrganismos patogênicos, para que a infecção se estabeleça. Assim, a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos pode ser útil para caracterizar a resposta do estado do hospedeiro (Desroche et al., 2005).

Estudos de expressão gênica são realizados utilizando-se a qPCR, onde a quantificação relativa é a abordagem mais adotada, na qual a quantificação da expressão gênica é normalizada em relação a um gene endógeno. Existem diversos estudos que têm apresentado a importância da identificação de genes endógenos adequados para análises de qPCR (Vandesompele et al., 2002; Hays, 2009; Silveira et al., 2009; Applied Biosystems, 2010; Kheirelseid et al., 2010; Schlosser et al., 2015; Rice et al., 2015). O propósito é padronizar as diferentes etapas para minimizar eventuais variações do procedimento experimental e como não há um gene endógeno universal para todos os tipos celulares, a escolha é definida por genes que apresentam expressão constante, para que apresentem o mesmo padrão de variação dentro do experimento quando comparados com a amostra testada (Expósito-Rodrigues et al., 2008).

Este conceito de quantificação relativa baseada na expressão de um gene endógeno necessita de uma estratégia adicional quando analisamos amostras consideradas mais difíceis. Embora os miRNAs circulantes sejam consistentemente relatados como estáveis no soro, vários fatores podem afetar sua quantidade (Arroyo et al., 2011).

Neste contexto, a utilização de um controle exógeno "*spike-in*" envolve o uso de um ou mais imitadores de miRNA sintéticos que são inseridos na extração de RNA, logo após a desnaturação de ribonucleases plasmáticas endógenas. Esses imitadores de miRNA são tipicamente de

C. elegans e não possuem homologia de sequência para miRNA de mamíferos. Os níveis desses controles podem ser usados para normalizar as diferenças na extração de RNA, transcrição reversa e na eficiência da qPCR (Schlosser et al., 2015).

1.10. Justificativa

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial com importantes repercussões na saúde pública. A forma cerebral da toxoplasmose é um evento definidor de aids em 75% dos casos. O reconhecimento precoce e o tratamento imediato reduzem o risco de sequelas neurológicas e a mortalidade. Contudo, o seu diagnóstico frequentemente baseado em imagens, pode ser confundido com outras patologias. Sendo assim, são necessárias estratégias mais eficazes para um diagnóstico diferencial. Os miRNAs são descritos como moléculas que exercem um importante papel na regulação da expressão gênica em células de eucariontes. Os miRNAs extracelulares são promissores biomarcadores em diversos tipos de cânceres e vem sendo largamente estudados no contexto de doenças infecciosas e parasitárias. Desta forma pretendemos investigar a expressão de miR-155, miR-146a, miR-21, miR-125b e miR-29c importantes na regulação da resposta imune em amostras de plasma de pacientes com toxoplasmose cerebral/aids, afim de que este estudo possa abrir perspectivas para a utilização destes conhecimentos na aplicação no diagnóstico e/ou prognóstico desta infecção, além de contribuir para estudos de novos alvos terapêuticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a expressão de cinco miRNAs (miR-155, miR-146a, miR-21, miR-125b, miR-29c) em plasma de pacientes com toxoplasmose cerebral e aids e comparar os resultados com os encontrados em plasma de indivíduos com toxoplasmose assintomática

2.2. Objetivos Específicos

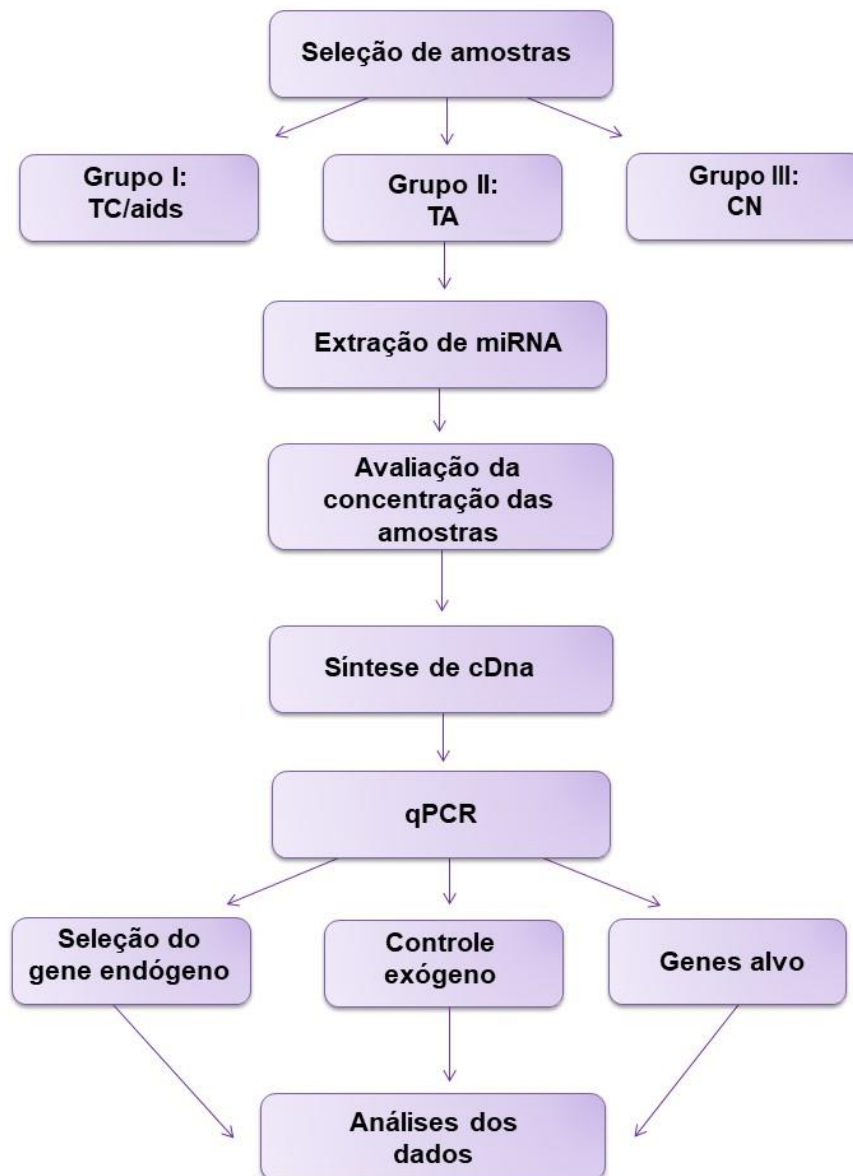
1. Padronizar um protocolo de extração de miRNA no plasma humano;
2. Realizar a seleção dos genes de referência para miRNA para normalizar as reações de expressão gênica por qPCR.
3. Realizar os testes e as análises dos dados de expressão gênica para os miRNAs miR-155, miR-146a, miR-21, miR-125b, miR-29c nas amostras selecionadas para o estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado na Plataforma Brasil/CTNBio) (CEPIAL) sob número 1.020.582 (ANEXO 1).

3.2. Delineamento Experimental



3.3. Pacientes e amostras clínicas

Neste estudo foram analisadas 79 amostras clínicas divididas em três grupos:

Grupo I: 32 amostras de pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (TC/aids), admitidos e tratados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

Grupo II: 27 amostras de indivíduos assintomáticos e soropositivos para toxoplasmose (TA).

Grupo III: 20 amostras de indivíduos soronegativos para toxoplasmose (controle negativo - CN).

As amostras do grupo II e do grupo III foram provenientes da soroteca do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.4. Diagnóstico da toxoplasmose

3.4.1. Sorológico

Em todas as reações foram utilizadas placas de polietileno (96 orifícios) de fundo chato, sensibilizadas com o antígeno (na concentração de 1 µg/mL) diluído em tampão bicarbonato de sódio e distribuídos nos orifícios, incubando-se por 18 horas a 4°C num volume de 50 µL/ orifício. Após cada etapa da reação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS 0,05%-Tween 20. Após a incubação, os orifícios foram bloqueados com 100 µL de PBS-leite desnatado 5% por 60 minutos em temperatura ambiente. As amostras (1/200) foram diluídas em PBS-leite e adicionadas nos orifícios da placa, em duplicata, num volume de 50 µL e incubadas por 60 minutos a 37°C. A seguir, as placas foram novamente incubadas com o segundo anticorpo IgG conjugado à peroxidase, na diluição de 1/20.000 por igual período. A revelação ocorreu com a adição de 100 µL do substrato enzimático contendo 0,5 mg/mL de orto-fenilenodiamina (OPD) diluído em fosfato de sódio dibásico (0,1M), ácido cítrico (0,1M) e H₂O₂ (0,1%) por 30 minutos em câmara escura,

à 37°C. A adição de 50 µL por poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4 N (diluído 1:9) interrompeu a reação após a incubação no escuro. Os resultados foram avaliados por leitura em espectrofotômetro (Sirio S- DiaLab Services) em comprimento de onda de 492 nm.

3.4.2. Molecular

As amplificações em qPCR foram realizadas utilizando o marcador molecular REP-529, “forward” (5'AGAGACACCGGAATGCGATCT3'); “reverse” (5'TTCGTCCAAGCCTCCGACT3'); e a sonda de hibridização (5'TCGTGATGGCGGAGAGAATTGA3') marcada com FAM (6-carboxyfluorescein) (Camilo et al., 2017). Para confirmar a qualidade das amostras de DNA e a ausência de inibidores de PCR, as amostras também foram analisadas utilizando um gene constitutivo, 18S de eucariotos “Eukaryotic 18S rRNA gene” (GenBank accession code X03205.1) (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL. As amostras de DNA (3 µL de cerca de 100 ng/µL), DNA de *T. gondii* - controle (5 ng/µL) foram misturadas com 10 µL do 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 1,25 µL do ensaio (18 µM do marcador “forward” e “reverse”; e 5 µM da sonda de hidrólise). Em cada reação foram incluídos um controle positivo, a partir de DNA extraído de taquizoítos mantidos em cultura e um controle negativo, onde foi utilizada água ultrapura que substituiu o DNA. As amplificações foram realizadas no AriaMx Real Time PCR System (Agilent Technologies), com o ciclo termal de 2 minutos, 50°C, e 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

3.5. Extração de RNA total contendo miRNA

A extração de RNA total contendo os miRNAs foi realizada utilizando o kit miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) segundo as recomendações do

fabricante. Foram utilizados 250 μL de plasma de cada amostra para a extração. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 16,100 g para retirada de detritos celulares. Em seguida, adicionou-se 1 mL de QIAzol ao sobrenadante de cada amostra. Após agitação em vórtex, as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 5 μL da molécula sintética de miRNA (cel-mir-39) na concentração de 25 fmol (como controle exógeno), homogeneizou-se e acrescentou-se 200 μL de clorofórmio. Os tubos foram agitados em vórtex por 15 segundos, permanecendo em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 16,000 g durante 15 minutos separando-se em três fases: a superior, aquosa e incolor (contendo o miRNA), uma interfase branca, e a fase inferior vermelha contendo o material orgânico. Então foram transferidos 600 μL da fase superior incolor para um novo tubo de 2 mL, evitando a transferência de qualquer material da interfase. Seguiu-se uma nova etapa onde foram acrescentados 900 μL de etanol 100% e após a homogeneização, foram acrescentados 700 μL de cada amostra em colunas RNeasy MinElute. Após centrifugação por 15 segundos a 9,300 g, o filtrado foi descartado e repetiu-se a etapa anterior com o restante da amostra. A seguir, adicionaram-se 700 μL do tampão RWT na coluna RNeasy MinElute e centrifugou-se a 9,300 g por 15 segundos, sendo descartado o filtrado. Em seguida, foram adicionados 500 μL do tampão RPE à coluna e centrifugou-se a 10,000 g por 15 segundos. Após o descarte do filtrado, foram adicionados 500 μL de etanol 80% e centrifugou-se a 9,300 g por 2 minutos. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor e realizou-se uma centrifugação a velocidade máxima durante 5 minutos para secar a membrana. Em seguida a coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL, adicionando-se 30 μL de água livre de DNase (DEPC) para a eluição do RNA total contendo os miRNAs após centrifugação de 1 minuto a velocidade máxima. O filtrado foi passado novamente pela coluna para obter um melhor rendimento do material.

3.6. Análise da concentração das amostras

Após a extração, as amostras foram quantificadas pelo espectrofotômetro Nanodrop ND100 (Thermo Fischer Scientific®). A pureza das moléculas de RNA foi avaliada utilizando-se a razão de absorbância da amostra entre 260 e 280 nm. A proporção de 1.8 foi interpretada como RNA livre de impurezas. A seguir, as amostras foram armazenadas -70°C até o momento do uso.

A concentração de miRNA foi realizada utilizando o kit Qubit microRNA Assay Kit (Life Technologies) e para o RNA foi utilizado o kit QuantiFluor RNA (Promega), seguindo as orientações dos fabricantes. Ambas as leituras foram realizadas no fluorímetro Quantus™ (Promega).

3.7. Síntese do DNA complementar (cDNA)

As fitas de cDNA foram sintetizadas a partir de 2 µL de RNA total contendo os miRNAs utilizando o Kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Life Technologies) conforme instruções do fabricante. O protocolo consiste em quatro etapas mostradas em detalhes na tabela 1.

3.8. qPCR

Após a síntese de cDNA, as amostras foram diluídas 1:10, conforme instruções do fabricante e, em seguida foi realizada a qPCR em ensaio customizado e produzido pela Applied Biosystems®. O mix de amplificação de qPCR continha 5 µL de TaqMan Fast Advanced Master Mix, 0,5 µL do ensaio TaqMan Advanced miRNA Assays (ambos Applied Biosystems) para os miRNAs descritos na tabela 2, cDNA (2,5 µL) e 2 µL de água livre de RNase. As reações foram realizadas em duplicatas num volume final de 10 µL. Para cada reação foi adicionado um controle negativo, compondo-se

somente do mix de amplificação. A análise da expressão dos miRNAs foram realizadas no equipamento StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando a seguinte ciclagem: 95 °C por 20 segundos; 40 ciclos de 95°C por 1 segundo; 60°C durante 20 segundos (modo Fast).

Tabela 1- Etapas do protocolo de síntese de cDNA.

Etapas do protocolo de síntese de cDNA				
	Componente	Volume	Condições da Ciclagem	
1) Reação de Adição da cauda poli A	10 X Poly (A) Buffer	0,5 µL	Poliadenização	37°C/45 min
	ATP	0,5 µL	Reação de Parada	65°C/10 min
	Poly A Enzyme	0,3 µL		
	H ₂ O RNase free	1,7 µL		
2) Reação de Ligação dos Adaptadores	5X DNA Ligase Buffer	3 µL	Ligação	16°C/60 min
	50% PEG 8000	4,5 µL	Hold	4°C/∞
	25X Ligation Adaptor	0,6 µL		
	RNA Ligase	1,5 µL		
	H ₂ O RNase free	0,4 µL		
3) Reação de transcrição reversa	5X RT Buffer	6 µL	Transcrição reversa	42°C/15 min
	dNTP mix (25 mM cada)	1,2 µL	Reação de Parada	85°C/5 min
	20X Universal RT primer	1,5 µL		
	10X RT Enzyme Mix	3 µL		
	H ₂ O RNase free	3,3 µL		
4) Reação de miR-Amp	2X miR-Amp Master Mix	25 µL	Ativação da Enzima	95°C/5 min
	20X miR-Amp Primer Mix	2,5 µL	Desnaturação	95°C/3 seg
	H ₂ O RNase free	17,5 µL	Anelamento/Extensão	60°C/30 seg
			Reação de Parada	99°C/10 min

Tabela 2- miRNAs investigados neste estudo.

		Nome	Número de acesso	Ensaio ID	Localização no cromossomo	Sequência de nucleotídeos
miR-155	Alvo	hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	477927_miR	Chr.21: 25573980 - 25574044 [+] on Build GRCh38	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
miR-146a	Alvo	hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	478399_miR	Chr.5: 160485352 - 160485450 [+] on Build GRCh38	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miR-21	Alvo	hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	477975_miR	Chr.17: 59841266 - 59841337 [+] on Build GRCh38	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-125b	Alvo	hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	477885_miR	Chr.11: 122099757 - 122099844 [-] on Build GRCh38	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA
miR-29c	Alvo	hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	479229_miR	Chr.1: 207801852 - 207801939 [-] on Build GRCh38	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
miR-26b	Endógeno	hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	478418_miR	Chr.2: 218402646 - 218402722 [+] on Build GRCh38	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU
miR-423	Endógeno	hsa-miR-423-3p	MIMAT0001340	478327_miR	Chr. 17 - 30117079 - 30117172 [+] on Build GRCh38	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAG U
miR-484	Endógeno	hsa-mir-484	MIMAT0002174	478308_miR	Chr.16: 15643294 - 15643372 [+] on Build GRCh38	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU
cel-miR-39	Exógeno	cel-miR-39-3p	MIMAT0000010	478293_miR	-	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

¹ID – Identificação do ensaio. ²hsa- *Homo sapiens*.

Fonte: <http://www.thermofisher.com>

3.9. Padronização da expressão dos genes endógenos

Para a determinação do gene endógeno ideal a ser utilizado como normalizador nos ensaios de expressão gênica de miRNA foram testadas 10 amostras de pacientes TC/aids.

Após a síntese de cDNA, a expressão dos genes endógenos foi determinada em duplicata por qPCR em ensaio customizado. Avaliamos a expressão de três genes constitutivos: miR-26b, miR-484, miR-423. Estes genes candidatos foram selecionados de acordo com a literatura (Applied Biosystems, 2010; Rice et al., 2015). As características dos miRNAs estão descritas na tabela 2. O mix de amplificação do qPCR continha 5 µL TaqMan® Fast Advanced Master Mix e 0,5 µL TaqMan® Advanced MicroRNA Assay (ambos Applied Biosystems) para os miRNAs descritos, 2,5 µL de cDNA e 2 µL de água livre de RNase, totalizando um volume final de 10 µL. Para cada reação foi adicionado um controle negativo. A análise da expressão dos miRNAs endógenos foram realizadas no equipamento StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando a seguinte ciclagem: 95 °C por 20 segundos; 40 ciclos de 95°C por 1 segundo; 60°C durante 20 segundos (modo Fast).

3.10. Análise dos dados

3.10.1. Avaliação da expressão dos genes endógenos

A estabilidade da expressão gênica foi avaliada pelo software geNorm (versão 3.5, <http://genorm.cmgg.be>) através dos resultados gerados na qPCR. Os valores de C_T (*Cycle threshold*) foram transformados em dados de quantificação relativa utilizando o “método de delta C_T ”, onde para cada miRNA o valor mais alto de C_T foi subtraído de todos os demais valores de C_T . Em seguida, foi aplicada a fórmula $2^{-\Delta C_T}$ e estes dados foram inseridos no geNorm, o qual promove a comparação aos pares da expressão dos genes

testados. Desta forma, um índice M foi gerado para cada miRNA e este índice é utilizado para se determinar o gene que apresenta expressão mais estável. O geNorm recomenda índice M abaixo do limite de 1,5, onde quanto menor o índice M, mais estável é a expressão do miRNA (Livak e Schmittgen, 2001).

3.10.2. Cálculo da quantificação de expressão gênica

A quantificação da expressão gênica foi avaliada pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), segundo Livak e Schmittgen (2001). Para a realização desta fórmula, primeiramente foi feita a correção da variação entre as amostras, subtraindo-se o valor obtido de C_T de cada amostra em relação ao C_T do gene endógeno, obtendo-se valor de ΔC_T . Após a obtenção desses valores, foi realizado o cálculo de $\Delta\Delta C_T$. Para tal, os valores obtidos de ΔC_T das amostras foram subtraídos do valor de ΔC_T da amostra calibradora. A utilização de uma amostra calibradora é recomendada para descrever quantas vezes o miRNA de estudo está sendo mais ou menos expresso em relação a este calibrador. Recomendam-se como calibradores da reação, amostras do tempo zero do estudo ou amostras controles (sem nenhum tratamento).

Neste estudo foi utilizado como calibrador para os cálculos de expressão, a média do grupo controle negativo, o qual de acordo com o método assume o valor de 1.0.

Após a determinação dos valores de $\Delta\Delta C_T$, aplicou-se a fórmula de quantificação relativa dada por: $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Os resultados foram descritos em média de quantificação relativa (RQ).

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}, \text{ onde } \Delta C_T = C_T \text{ alvo} - C_T \text{ endógeno, e} \\ \Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ amostra} - \Delta C_T \text{ do calibrador}$$

3.10.3. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA). As diferenças entre os três grupos para cada miRNA foram analisadas usando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ANOVA. A comparação da expressão entre os grupos TC/aids e TA foi determinada pelo teste *Mann-Whitney* (teste T não paramétrico). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,00005$).

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose

Para as 32 amostras de pacientes TC/aids foi realizado o teste sorológico pelo ELISA (IgG) e qPCR no sangue para toxoplasmose. Todos apresentaram ELISA positivo e 17 foram positivos na qPCR. Esses pacientes tinham diagnóstico sorológico positivo para HIV, valores de células T CD4⁺<200/μL e evidências de imagem tomográfica de lesão expansiva. Para as amostras dos grupos TA e CN foi realizado somente o ELISA (Tabela 3).

Tabela 3- Resultados clínicos e laboratoriais das amostras.

	Grupos		
	TC/aids ^a (n = 32)	TA ^b (n = 27)	CN ^c (n = 20)
Diagnóstico clínico ^d	Toxoplasmose cerebral e aids	Toxoplasmose Assintomática	ND ^e
ELISA	Reagente (32/32)	Reagente (27/27)	Não reagente (20/20)
qPCR	Positivo (17/32)	ND	ND
Gênero	15M - 17F	12M - 15F	2M – 18F

^a TC/aids (toxoplasmose cerebral e aids); ^b TA (toxoplasmose assintomática); ^c CN (controle negativo);

^d O diagnóstico foi definido por dados clínicos, de imagens e laboratoriais; ^e ND (não determinado).

4.2. Controle exógeno

Como mencionado no item 3.5. de Material e Métodos, a molécula sintética cel-miR-39 foi adicionada em cada amostra no momento da extração de RNA e detectada na qPCR. Em todas as amostras utilizadas nesse estudo

houve a expressão do cel-mir-39 indicando uma boa qualidade da extração. A tabela 4 mostra as médias de CTs das amostras utilizadas nesse estudo.

Tabela 4- Média de CT do controle exógeno (cel-miR-39).

Grupos	Média de CT	Intervalo de CT (min- máx)
TC/aids ^a	26,05	(21,47 - 29,67)
TA ^b	25,95	(21,99 - 33,53)
CN ^c	28,25	(21,41 - 37,76)

^a TC/aids (toxoplasmose cerebral e aids); ^b TA (toxoplasmose assintomática) e ^c CN (controle negativo).

4.3. Quantificação de RNA total e miRNA

As médias de quantificação do grupo TC/aids pelo fluorímetro para o RNA total foram 2,24 ng/μL e para o miRNA 0,0551 ng/μL. O grupo TA obteve uma média de 1,11 ng/μL de RNA total e 0,0612 ng/μL de miRNA. Já o grupo CN a média foi de 1,36 ng/μL de RNA total e 0,0451 ng/μL de miRNA (Tabela 5).

Tabela 5- Quantificação de RNA total e miRNA das amostras de plasma utilizadas neste estudo.

Quantificação das amostras (ng/μL)*				
	RNA total		miRNA	
	Média	Intervalo (min-max)	Média	Intervalo (min-max)
TC/aids ^a	2,24	0,11- 12,00	0,0551	0,0252 - 0,0991
TA ^b	1,11	0,11 - 3,80	0,0612	0,0270 - 0,1240
CN ^c	1,36	0,21- 9,90	0,0451	0,0384 - 0,0601

^a TC/aids (toxoplasmose cerebral e aids); ^b TA (toxoplasmose assintomática) e ^c CN (controle negativo).
* Realizadas em um Fluorímetro (QubitTM Quantitation Platform).

4.4. Determinação dos genes endógenos candidatos

Os experimentos iniciais foram realizados para normalizar os ensaios de expressão gênica. Foram testados três miRNAs: miR-26b, miR-423 e miR-484 em 10 amostras de plasma de pacientes com TC/aids. Os valores de CT foram transformados em dados de quantificação relativa utilizando o “método de delta CT” conforme mostra a tabela 6.

Após a avaliação pelo geNorm, os resultados mostraram que os genes candidatos miR-423 e miR-484 apresentaram valores de M inferiores a 1,5, que é considerado o valor de corte para a adequação. Os valores de índice M foram: 1,354 para o miR-484, 1,463 para o miR-423 e 1,927 para o miR-26b. Desta forma, de acordo com a classificação do geNorm, o miR-484 foi considerado como gene ideal por apresentar maior estabilidade e menor variabilidade entre as amostras. O miR-26b foi altamente variável, não sendo um bom candidato a normalizador. Todos os valores de M encontram-se ilustrados na figura 8.

Tabela 6- Valor de $2^{-\Delta CT}$ para os genes endógenos.

Plasma	miR-26b			miR-423			miR-484		
	\bar{x} CT	Δ CT	$2^{-\Delta Ct}$	\bar{x} CT	Δ CT	$2^{-\Delta Ct}$	\bar{x} CT	Δ CT	$2^{-\Delta Ct}$
3025T/RPR	33,77*	0,00	1,00	33,22*	0,00	1,00	29,47	-0,52	0,70
3034T/SJR	29,02	-4,76	0,04	27,03	-6,19	0,01	24,85	-5,15	0,03
3052T/RBF	31,65	-2,13	0,23	27,09	-6,14	0,01	24,84	-5,16	0,03
3056T/WSJ	31,98	-1,81	0,29	32,15	-1,07	0,48	29,99*	0,00	1,00
3074T/ALS	29,12	-4,66	0,04	26,81	-6,42	0,01	23,53	-6,47	0,01
3075T/NMJ	25,99	-7,80	0,00	23,61	-9,61	0,00	22,20	-7,80	0,00
3167T/SEM	26,72	-7,07	0,01	25,05	-8,18	0,00	24,13	-5,86	0,02
3168T/MSMP	25,14	-8,64	0,00	24,75	-8,48	0,00	23,47	-6,52	0,01
3319T/RFS	28,67	-5,12	0,03	30,69	-2,53	0,17	28,38	-1,62	0,33
1477/JAXF	29,26	-4,53	0,04	30,37	-2,86	0,14	26,16	-3,84	0,07

* Valor de CT mais alto

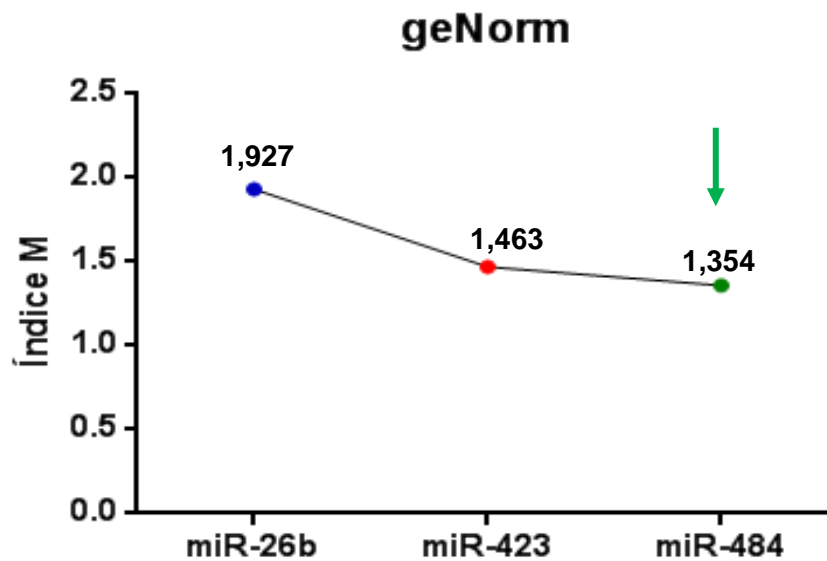


Figura 8. Média de estabilidade de expressão (Índice M). O miRNA mais estável é o que apresentou valor de M inferior a 1,5 (Vandesompele, 2002).

4.5. Expressão gênica dos miRNAs alvos

No passo seguinte, as análises dos miRNAs foram realizadas nos três grupos estudados. Conforme descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos, o grupo controle negativo utilizado com calibrador assume o valor de 1,0.

A figura 9 mostra a quantificação relativa dos níveis de miR-146a onde, a média de RQ para o grupo TC/aids foi de $2,500 \pm 0,3243$ (média \pm erro padrão da média) dos indivíduos assintomáticos, $1,661 \pm 0,2131$. Já os níveis de expressão do miR-21 no grupo de TC/aids foi de $3,829 \pm 0,5787$ e do grupo TA foi de $1,815 \pm 0,1514$. As diferenças entre os três grupos foram estatisticamente significantes em $p=0,0011$ (miR-146a) e $p=0,0001$ (miR-21) no teste ANOVA (Figura 10).

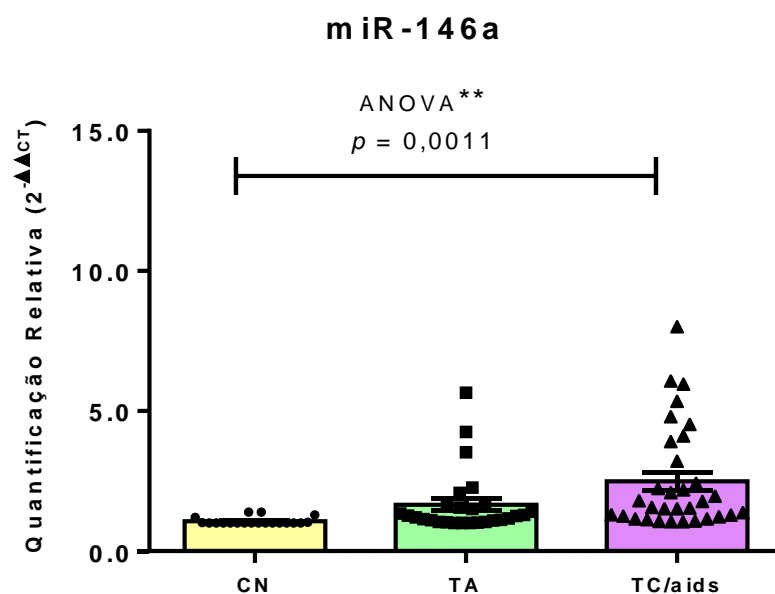


Figura 9. Quantificação relativa dos níveis de miR-146a do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ obtidos pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2, de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (** $p=0,0011$).

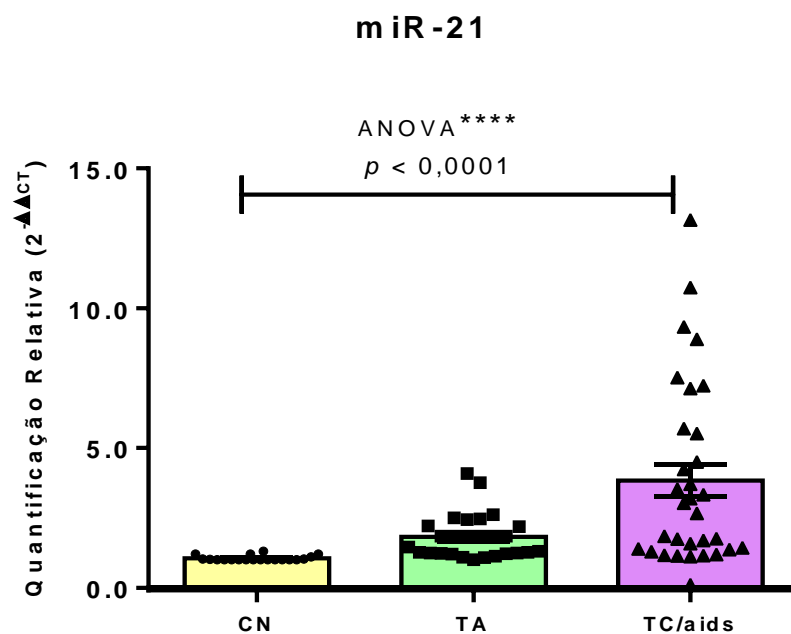


Figura 10. Quantificação relativa dos níveis de miR-21 do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ após o cálculo determinado pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2, de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (**** $p<0,0001$).

Para o miR-155, as médias de RQ do grupo TC/aids e TA foram de $1,243 \pm 0,03406$ e $1,651 \pm 0,2536$, respectivamente. As diferenças entre os três grupos foram estatisticamente significantes, com $p= 0,0334$ no teste ANOVA (Figura 11).

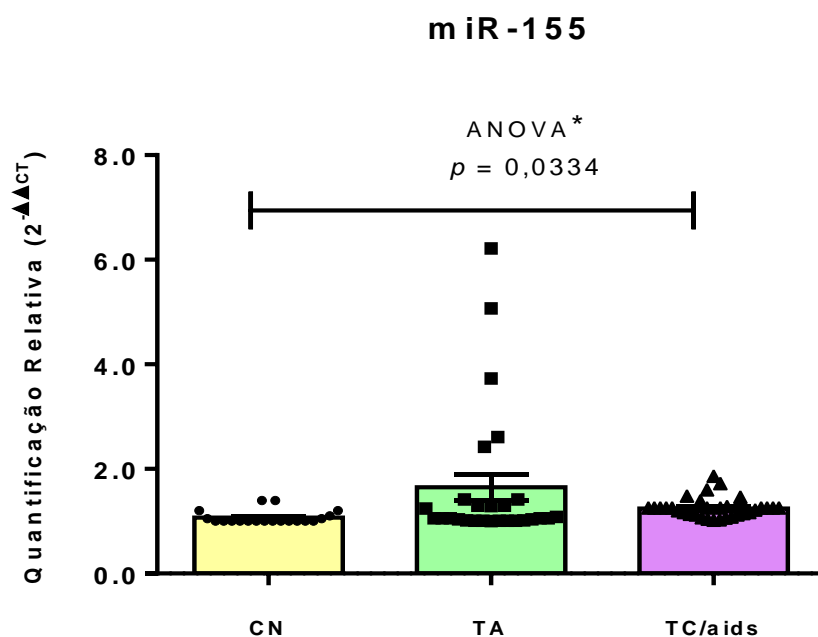


Figura 11. Quantificação relativa dos níveis de miR-155 do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ após o cálculo determinado pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes ($*p<0,0334$).

As figuras 12 e 13 mostram a quantificação relativa dos níveis de expressão de miR-125b e miR-29c. Para o miR-125b a média de RQ foi de $2,041 \pm 0,2451$ para o grupo TC/aids e $2,026 \pm 0,2150$ para o grupo TA. Em relação ao miR-29c, a média de RQ para o grupo TC/aids e o assintomático foram de $1,486 \pm 0,1164$ e $1,315 \pm 0,09640$, respectivamente. Como o grupo controle negativo foi diferente dos grupos, as diferenças entre os três grupos foram estatisticamente significantes em $p= 0,0181$ (miR-29c) e $p= 0,0049$ (miR-125b) no teste ANOVA.

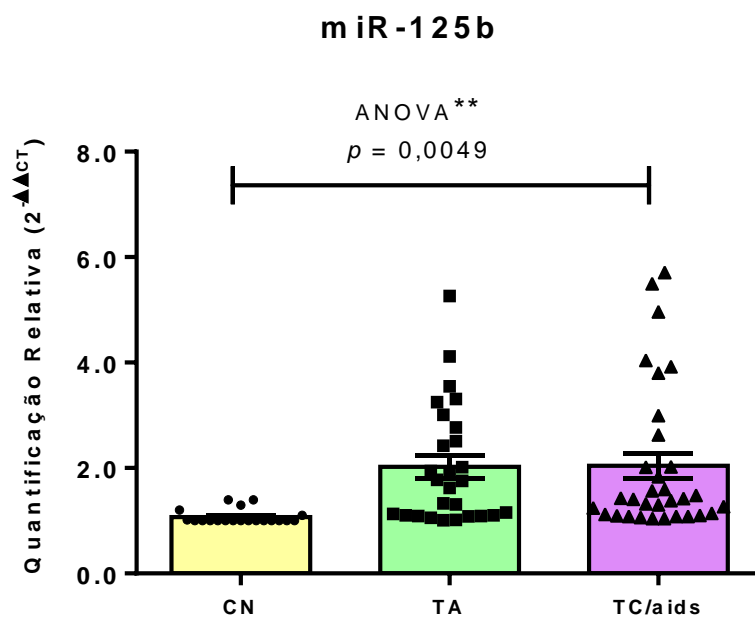


Figura 12. Quantificação relativa dos níveis de miR-125b do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ após o cálculo determinado pelo método do “ C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (** $p < 0,0049$).

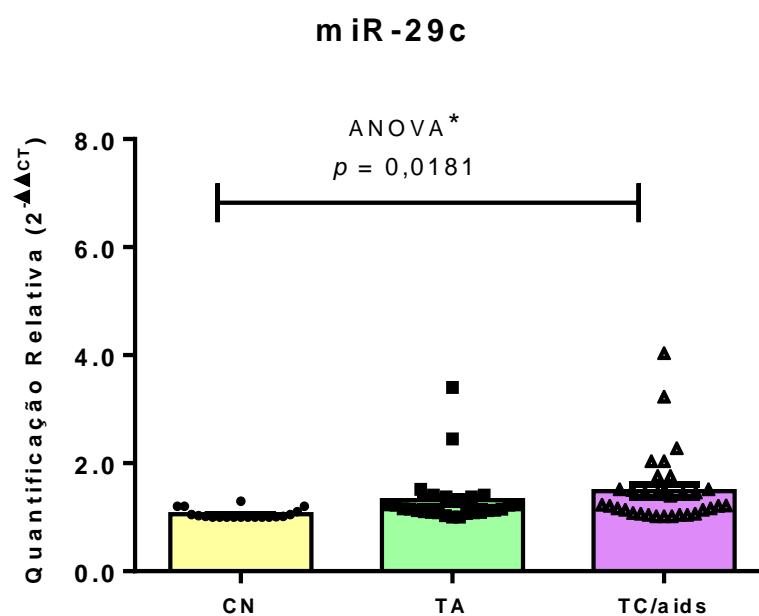


Figura 13- Quantificação relativa dos níveis de miR-29c do controle negativo (amarelo), indivíduos com toxoplasmose assintomática (verde) e pacientes com toxoplasmose cerebral/aids (lilás). Os valores são expressos em RQ após o cálculo determinado pelo método do “ C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes (* $p < 0,0181$).

Em seguida, foi feita a comparação entre os grupos TC/aids e assintomáticos para os cinco miRNAs investigados (Figura 14).

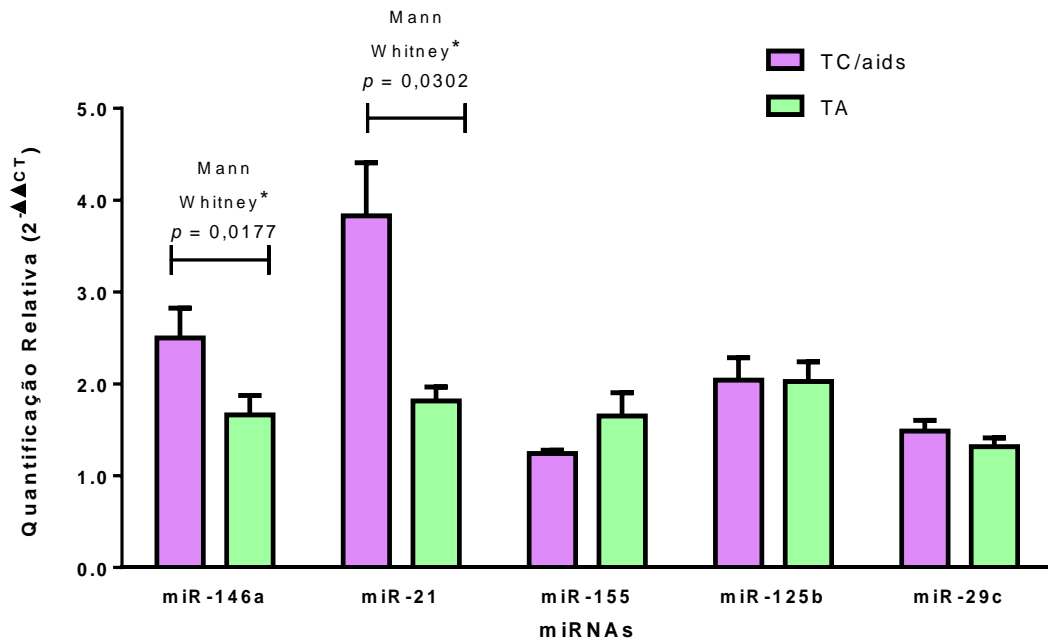


Figura 14- Comparação da quantificação relativa dos níveis de miRNAs investigados em plasma de pacientes com toxoplasmose cerebral/aids e indivíduos assintomáticos e soropositivos para toxoplasmose. Os valores são expressos em RQ após o cálculo obtido pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.10.2. de Material e Métodos. As diferenças dos níveis de expressão de miR-146a ($*p < 0,0177$) e do miR-21 ($*p < 0,0302$) foram estatisticamente significantes.

A análise estatística mostrou que o grupo TC/aids expressou significativamente níveis maiores de miR-146a e miR-21 do que o grupo TA, com $p = 0,0107$ (miR-146a) e $p = 0,0302$ (miR-21) pelo teste Mann-Whitney. miR-155, miR-125b e miR-29c não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos estudados.

5. DISCUSSÃO

A primeira parte do presente trabalho consistiu na seleção das amostras clínicas através do diagnóstico dos grupos de plasmas estudados. Após o diagnóstico clínico, radiológico e sorológico das amostras provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, foi realizado o diagnóstico sorológico por ELISA utilizando o antígeno bruto de *T. gondii* a partir de taquizoítos sonicados (Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008), obtendo resultado reagente para todas as amostras desse grupo. Para o diagnóstico molecular por qPCR utilizando o iniciador REP 529 (Camilo et al., 2017), das 32 amostras de plasma somente 17 foram reagentes, sendo que a sensibilidade do resultado pode ter sido afetada por diversos fatores.

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, foi realizada a sorologia das amostras de plasma, obtendo 27 amostras reagentes e 20 amostras não reagentes. Não foi realizada qPCR nas amostras reagentes por ser tratar de uma infecção crônica, sendo que para isto é necessário que o parasita esteja circulante no sangue.

Após a seleção das amostras, a segunda parte desse estudo foi direcionada para investigar a expressão de cinco miRNAs nas amostras de plasmas dos grupos estudados.

Os miRNAs são considerados mecanismos reguladores fundamentais da expressão gênica. Tanto os miRNAs celulares quanto os circulantes são alterados durante determinada doença e podem refletir patologias cerebrais (Backes et al., 2016). Por serem moléculas altamente estáveis em fluidos corporais, tais como soro e plasma, podem ser utilizados como potenciais biomarcadores de várias doenças (Chen et al., 2008).

A qPCR é um dos métodos de quantificação mais sensível e reprodutível para análise de expressão gênica, no entanto, muitos fatores podem afetar os resultados. Sendo assim, a alternativa ideal seria a utilização de um ou alguns controles de referência internos específicos para garantir

uma correta normalização e interpretação de resultados, com base na suposição de que o nível de expressão de genes endógenos não muda de amostra para amostra (Schlosser et al., 2015; Stassen et al., 2015).

As padronizações dos níveis de expressão dos miRNAs alvos foram realizadas testando-se os níveis de expressão dos miRNAs endógenos (miR-484, miR-423 e miR-26b) para serem normalizadores das amostras de plasma. As análises foram realizadas no programa de computador geNorm, o qual calcula a estabilidade de expressão dos genes candidatos gerando um índice M para cada miRNA. Um gene é considerado estável quando apresenta o menor valor de M, sendo este menor que 1,5 (Vandesompele et al., 2002).

Os resultados mostraram que o miR-484 foi o gene endógeno ideal para as amostras de plasma utilizadas neste estudo, pois teve o menor valor de M (1,354). O gene miR-423 teve um índice M= 1,463, que é menor do que o recomendado, porém o valor obtido foi maior que o miR-484. O miR-26b, para este estudo, não mostrou ser um bom candidato a normalizador por apresentar um índice M maior que o recomendado.

O miR-484, é um gene endógeno usado comumente na pesquisa de miRNAs de plasma (Rice et al., 2015). Foi identificado como um supressor na tradução de proteínas (Wang et al., 2012; Zearo et al., 2014), está relacionado ao diagnóstico e à recorrência de tumores multiplicadores, como câncer de pulmão (Li et al., 2017), câncer de próstata (Pashaei et al., 2017) e carcinoma de tireoide (Stokowy et al., 2016). Alguns estudos mostraram que o miR-484 é altamente expresso em células cancerígenas de cardiomiócito e adrenocortical e pode inibir a fissão mitocondrial e a apoptose (Wang et al., 2012).

Os genes endógenos geralmente estão envolvidos em alguma função celular básica subjacente e são expressos constitutivamente em algum nível basal em todas as células em condições normais e anormais. Esses níveis de expressão são essenciais para uma comparação com os níveis anormais (Gee et al., 2011; Kumar et al., 2013; McDermott et al., 2013; Rice et al., 2015).

A validação experimental para cada situação é um requisito essencial (Dheda et al., 2004), porque alguns genes endógenos que são adequados

para amostras de plasma podem não ser em amostras de tecido (Rice et al., 2015). Portanto, para uma análise precisa da expressão do gene, é de crucial importância à validação de genes endógenos candidatos. Além disso, a seleção deve ser confirmada por pelo menos um algoritmo, como geNorm ou Normfinder (Bustin et al., 2009).

A maioria dos resultados obtidos por qPCR utiliza diferentes genes endógenos para normalização. O uso destes genes é um recurso válido uma vez que são afetados pelas mesmas fontes de variabilidade dos miRNAs alvo, durante todas as etapas do procedimento experimental. Um controle endógeno ideal para amostras de soro/plasma deve ser expresso em todas as amostras, ter níveis basais de expressão e que estes níveis sejam mensuráveis (Rice et al., 2015). A maioria das pesquisas baseadas em miRNA de plasma requer, o uso de um gene endógeno como um marcador ou referência confiável e reproduzível para comparar a expressão de outros miRNAs (Rice et al., 2015). No entanto, como o estudo de miRNAs é um campo relativamente novo, há poucos relatos a cerca da padronização da metodologia, dificultando a comparação de diferentes estudos entre si.

Devido a alta estabilidade, os miRNAs são menos suscetíveis a variações durante o processamento, portanto, sua detecção pode ser mais confiável do que a de outros marcadores moleculares, indicando seu uso potencial como biomarcadores não invasivos (Blondal et al., 2013; Glinge et al., 2017). Os miRNAs circulantes preenchem vários critérios de um biomarcador ideal, por serem estáveis em biofluidos como soro, plasma, LCR, urina e saliva (Chen et al., 2008; Ghai e Wang et al, 2016; Glinge et al., 2017; Schraml et al., 2017), sofrem regulação específica de tecido para tecido e durante a doença, são altamente sensíveis e específicos (Romaine et al., 2015) e têm ampla biodisponibilidade.

Visando o futuro emprego dos miRNAs como biomarcadores, o objetivo desse estudo foi avaliar expressão de cinco miRNAs (miR-146a, miR-21, miR-155, miR-125b e miR-29c) na toxoplasmose cerebral e aids em comparação com os indivíduos com toxoplasmose assintomática. Nossos resultados

demonstraram que o miR-146a teve um aumento significativo de expressão no grupo TC/aids em comparação com o grupo TA.

Houve aumento da expressão do miR-146a em pacientes TC/aids, mostrando que esse miRNA pode representar um mecanismo regulador alternativo para ajustar a resposta inflamatória mediada por IFN- γ , ajudando a limitar a inflamação excessiva do SNC após estimulação pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Saba et al., 2014; Slota e Booth, 2019).

Os miRNAs regulam a ativação e diferenciação das células T, tanto as efectoras como as células T_{reg} (Kanno et al., 2012). As células T do sistema imune adaptativo desempenham um papel central na luta contra a invasão de patógenos. A iniciação e resolução das respostas dessas células devem ser rigorosamente reguladas para evitar processos inflamatórios e possíveis patologias (Yang et al., 2012). A ativação de células T é desencadeada pelo receptor de células T (TCR), que determina a especificidade da célula. O acoplamento de TCR induz uma cascata de sinalização levando à ativação de fatores de transcrição, entre eles, o fator NF- κ B que está envolvido na proliferação, sobrevivência e funções efectoras das células T (Schulze-Luehrmann e Ghosh, 2006).

Em células T humanas, miR-146a é induzido no acoplamento de TCR e é abundante em células de memória (Curtale et al., 2010). O estudo da expressão de miR-146a em células T CD4⁺ e CD8⁺ revelou que a estimulação de TCR ativa o NF- κ B, que induz a expressão de miR-146a. O miR-146a, por sua vez regula negativamente a atividade do NF- κ B, reprimindo os ativadores TRAF6 (Fator associado ao receptor do TNF) e IRAK-1 (quinase associada ao receptor da IL-1) (Yang et al., 2012). Assim, miR-146a atua como uma rede reguladora de feedback negativo que modula a sinalização de TCR para NF- κ B. A ativação desregulada do NF- κ B nas células T foi associada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias e neoplasias mediadas por células T (Karin e Greten, 2005; Jost e Ruland, 2007).

miR-146a está envolvido na regulação de T_{reg} pela via de sinalização STAT1/IFN- γ , restringindo as respostas Th1 patogênicas mediadas por IFN- γ (Lu et al., 2010). A redução na expressão de miR-146a

de T_{reg} de camundongos resulta em imunopatologia mediada por linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th1) que é dependente de IFN- γ , ocasionando uma quebra da tolerância (Saba et al., 2014).

Os miRNAs estão sujeitos a intensa regulação, principalmente nos níveis de transcrição e processamento, onde estes regulam a produção de citocinas, mas também as citocinas podem modular os seus níveis (Amado et al., 2015). Durante a infecção por *T. gondii*, a citocina essencial para a resistência é a IFN- γ , onde tanto a expressão baixa quanto a expressão excessiva podem ser prejudiciais ao hospedeiro (Saba et al., 2014).

A deficiência na síntese de IFN- γ é um defeito no sistema imune de indivíduos infectados por HIV, o qual seria responsável pela liberação e crescimento do parasita resultando em patologia (Gazzinelli et al., 1995; Körner et al., 2010). Meira et al. (2014) observaram em seu estudo um perfil de deficiência na produção de IFN- γ em pacientes com TC/aids. Embora o miR-29 também seja descrito como um regulador negativo da expressão do IFN- γ (Ma et al., 2011), em nosso estudo não observamos um aumento da expressão desse miRNA.

Apesar da família miR-29 não ser muito estudada, alguns autores relatam a sua importância na resposta imune adaptativa através da regulação da expressão de IFN- γ (Ma et al., 2011; Steiner et al., 2011). Wang, M e colaboradores (2019), mostraram que a regulação positiva da expressão do miR-29c, reduziu a expressão do receptor de TNF 1A (TNFRSF1A), TNF- α , IL-6 e IL-1 β que reduziu a gravidade da depressão pós Acidente Vascular Cerebral (AVC). TNFRSF1A codifica um receptor para o fator de necrose tumoral (TNF), uma citocina pró-inflamatória implicada em uma ampla gama de distúrbios (Loetscher et al., 1990, Zhou et al., 2006).

A IL-2, também chamada de “fator de crescimento de células T” é uma citocina que promove respostas imunes dependentes de células T e foi introduzida como importante regulador do repertório de miRNA durante a expansão das células T. Inibir a expressão de IL-2 é um mecanismo possível para prevenir a ativação das células T (Amado et al., 2015). A superexpressão do miR-146a e do miR-125b diminui a produção de IL-2, no entanto, o

mecanismo exato por trás dessa inibição ainda não foi esclarecido na literatura (Curtale et al., 2010).

miR-125b também tem sido implicado no desenvolvimento de doenças inflamatórias, bem como na diferenciação de células T (Wei e Pei, 2010). Foi descrito que a expressão de miR-125b foi regulada positivamente após a ativação das células T CD4⁺ e poderia regular a diferenciação dessas células (Rossi et al., 2011). Assim, este achado sustenta os nossos resultados, onde a baixa expressão desse miRNA em nossas amostras pode estar relacionada a níveis inferiores de linfócitos T CD4⁺ em pacientes com aids.

O miR-125b pode ter como alvo o mRNA do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e a expressão negativa leva à produção elevada de TNF- α e, conseqüentemente, ao aumento da resposta inflamatória. Chaudhuri et al. (2011) mostraram que o miR-125b é enriquecido em macrófagos e que a expressão elevada do miR-125b promove a ativação da resposta de IFN- γ . Neste estudo, o miR-125b foi diminuído em pacientes com TC/aids corroborando assim com outras pesquisas onde baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de TNF- α foram encontrados em pacientes com toxoplasmose cerebral (Meira et al., 2014).

Em camundongos infectados por *T. gondii*, miR-155 mostrou ser necessário para a expressão de citocinas pelas células Th17 e para a homeostase das células T_{reg}, mas não para a resposta Th1 contra o parasita (Escobar et al., 2014). Ainda, miR-155 mostrou reprimir as citocinas produzidas pelas células Th2 e a diferenciação *in vitro* das células T CD4⁺ deficientes em miR-155 mostrou um aumento nos níveis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (Rodriguez et al., 2007).

A IL-10 inibe a síntese de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, e se constitui em um importante modulador das funções efetoras dos macrófagos contra diferentes patógenos, inclusive *T. gondii* (Gazzinelli et al., 1992; Tait e Hunter, 2009). Meira et al. (2014), mostraram que pacientes com TC/aids apresentaram pequena produção de IL-10 e este resultado reforça a hipótese de que, esta deficiência estaria relacionada a

infecção por HIV, bem como o miR-155 também poderia estar envolvido nesta regulação.

Em adição, o miR-155 é regulado positivamente em resposta a estímulos pró-inflamatórios e sua inibição pode ser uma estratégia viável para reduzir a resposta inflamatória, conduzindo ao estado inflamatório crônico em humanos (O'Connell et al., 2012 ; Bruen et al., 2019). Desta forma, nossos dados mostraram que o miR-155 poderia estar envolvido na resposta imune crônica, uma vez que os pacientes com TC/aids apresentaram baixos níveis deste miRNA.

A IL-4 é uma citocina que inibe a ativação de macrófagos mediada por IFN- γ . Em contraste com o miR-155, que diminui a sua expressão, o miR-21 aumenta. A deficiência de miR-21 impacta indiretamente no equilíbrio de células Th1/Th2 (Lu et al., 2011). Este miRNA atua também como um regulador negativo do TLR-4 e inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e IFN- γ (Sheedy et al., 2010).

Tanto o miR-146a como o miR-21 têm como alvo componentes diferentes das vias TLR e NF- κ B, trabalhando conjuntamente para suprimir a ativação dessas vias (He et al., 2016; Sheedy et al., 2010; Wang et al., 2015). Isso corrobora com os nossos dados, pois além da expressão positiva do miR-146a, observou-se também um aumento significativo da expressão do miR-21 em pacientes com toxoplasmose cerebral/aids.

Em conclusão, estes resultados sugerem que o miR-146a e miR-21 estariam relacionados na regulação da resposta imune na toxoplasmose cerebral/aids. Entretanto, mais estudos com um número maior de amostras são necessários para avaliá-los como potenciais biomarcadores.

Apesar do aumento significativo de estudos referentes a miRNAs, existem poucos que avaliaram essa associação com a toxoplasmose. Até o momento, este é o primeiro estudo que visou investigar a expressão de miRNAs em pacientes com toxoplasmose cerebral/aids. Há muito potencial para identificar esses padrões específicos, avaliando o papel de miRNAs como estratégias para diagnóstico, prognóstico e intervenções terapêuticas.

6. CONCLUSÕES

- A extração de miRNA no plasma humano foi padronizada com sucesso.
- Os resultados mostraram que o miR-484 foi o gene endógeno ideal a ser utilizado como normalizador nas amostras de plasma em ensaios de expressão gênica.
- Os ensaios de expressão gênica testando os miR-155, miR-146a, miR-21, miR-125b, miR-29c em plasma de pacientes com toxoplasmose cerebral/aids e indivíduos com toxoplasmose assintomática foram realizados com sucesso, sendo que o miR-146a e miR-21 foram significativamente mais expressos nos pacientes com toxoplasmose cerebral/aids.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abgrall S, Rabaud C, Costagliola D. Incidência e fatores de risco para encefalite toxoplásmica em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana antes e durante a era da terapia antirretroviral altamente ativa. *Clin Infect Dis* 2001; 33 10:1747-55.

Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal Eukaryotic Microbiology* 2012; 59: 429–493.

Albarillo F, O’Keefe P. Opportunistic Neurologic Infections in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2016; 16:10.

Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mut. Res* 2011; 717: 1–8.

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.

Amado T, Schmolka N, Metwally H, Silva-Santos B, Gomes AQ. Cross-regulation between cytokine and microRNA pathways in T cells. *Eur. J. Immunol* 2015; 45: 1584–1595.

Amaral BA, Nonaka CFW, Freitas, RA. MicroRNAs – Biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. *Odontologia Clínica-Científica*, 2010; 9:105-09.

Amato NV, Marchi CR. Toxoplasmose. In: Cimerman B & Cimerman S, editors. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p. 160-77.

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

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, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, et al. Prevalência, fatores associados e determinantes prognósticos da encefalite toxoplásmica relacionada à AIDS na era da terapia antiretroviral avançada altamente ativa. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1681 - 1691.

Applied Biosystems. Endogenous controls for real-time quantitation of miRNA using taqman microrna assays. Application Note. USA; 2010.

Arner P, Kulyte A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11:276-288.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating micrornas independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108, 12:5003-8.

Avelino MM, Campos Júnior D, Parada JCB, Castro AM. Pregnancy as a risk factor for acute Toxoplasmosis seroconversion. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2003; 108:19-24.

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

Backes C, Meese E, Keller A. Specific mirna Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol. Diagn. Ther.* 2016; 20: 509–518.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116:281-97.

Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 205-215.

Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-Cell Communication: MicroRNAs as Hormones. *Mol. Oncol.* 2017; 11:1673–1686.

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.

Berger-Schoch AE, Bernet D, Doherr MG, Gottstein B, Frey CF. *Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle. *Zoonoses Public Health* 2011; 58: 472-478.

Bezerra RA, Carvalho FS, Guimarães LA, Rocha DS, Silva FL, Wenceslau AA, Albuquerque GR. Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs. *Parasitology Research* 2012; 110: 509-14.

Bhatt K, Kato M, Natarajan R. Minireview: emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; 310:109-18.

Biggar KK, Storey KB. Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *Journal of Experimental Biology* 2015; 218:1281-1289.

Black MW, Boothroyd JC. Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000; 64: 607-623.

Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune invasion and virulence. *APMIS* 2009; 117: 458-476.

Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol.* 2015; 69: 463-85.

Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreassen D, Mouritzen P, Wrang Teillum M, Dahlsveen IK. Assessing sample and mirna profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 2013; 59:164–169.

Bonfioli AA, Orefice F. Toxoplasmosis. *Semin Ophthalmol* 2005; 20:129-41.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA Polymerase III Transcribes Human MicroRNAs. *Nat. Struct.Mol. Biol.* 2006; 13: 1097–1101.

Borges RT, Corrêa DF, Neto PDB, Rocha LB, Araujo FMS, Sousa BA. Toxoplasmose e suas repercussões oftalmológicas – uma revisão. *Rev Med Saude Brasilia* 2017; 6:261-9.

Bowen LN, Smith B, Reich D, Quezado M, Nath A. HIV-associated opportunistic CNS infections: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Neurology* 2016; 12: 662 – 674.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005; 3: e85.

Bretagne S. Molecular diagnosis in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 505-511.

Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP Jr., Liu L, Babulas VP, Susser ES. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry* 2005; 162:767-73.

Bruen R, Fitzsimons S, Belton O. Mir-155 in the Resolution of Atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology* 2019; 10:463.

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

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009; 55:611–622.

Caiaffa WT, Chiari CA, Figueiredo AR, Orefice F, Antunes CM. Toxoplasmosis and mental retardation. Report of a case-control study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88:253-261.

Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Fice F, Antunes CM. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001 p. 278-287.

Camilo LM, Pereira-Chiocola VL, Gava R, Meira-Strejevitch CDS, Vidal JE, Brandão de Mattos CC, et al. Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2017; 21:638-647.

Canella D, Brenier-Pinchart MP, Braun L, Van Rooyen JM, Bougdour A, Bastien O et al. miR-146a and miR-155 delineate a MicroRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell Rep* 2014; 6: 928-937.

Chaudhuri AA, So AY, Sinha N, Gibson WS, Taganov KD, O'Connell RM, et al. MicroRNA-125b potentiates macrophage activation. *J Immunol* 2011 Nov 15; 187:5062-8.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K. Characterization of micrnas in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18:997–1006.

Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, et al. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*. 2007; 54:813-29.

Coelho L, Cardoso SW, Amancio RT, Moreira RI, Campos DP, Veloso VG, et al. Trends in AIDS-Defining Opportunistic Illnesses Incidence over 25 Years in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE* 2014; 9: e98666.

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

Colina D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect* 2002; 8: 634-640.

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.

Cong W, Zhang XX, He, JJ, Li FC, Elsheikha HM, Zhu, XQ. Global mirna expression profiling of domestic cat livers following acute *Toxoplasma gondii* infection. *Oncotarget* 2017; 8: 25599-25611.

Connolly MP, Goodwin E, Schey C, Zummo J. Toxoplasmic encephalitis relapse rates with pyrimethamine-based therapy: systematic review and meta-analysis. *Pathog Glob Health* 2017; 111:31-44.

Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chioccola VL. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 2008; 120: 227-234.

Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas de Parasitárias. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. microRNAs and cancer. *APMIS* 2007; 115:1090–1106.

Cristo A, Britto C, Fernandes, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: Revisão. *Bras Patol Med Lab* 2005; 41:229-35.

Cummings PL, Kuo T, Javanbakht M, Sorvillo F. Trends, Productivity Losses, and Associated Medical Conditions Among Toxoplasmosis Deaths in the United States, 2000–2010 *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91: 959 – 964.

Curtale G, Citarella F, Carissimi C, Goldoni M, Carucci N, Fulci V, et al. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood* 2010; 115:265-73.

Dabis F, Bekker LG. We still need to beat HIV. *Science* 2017; 357-335.

Deiuliis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes* 2016; 40: 88-101.

Denkers EY. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. *J Biomed Biotechnol. Review.* 2010: 737125.

Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques.* 2004; 37:112–119.

Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *The New England Journal of Medicine.* 1974; 290:1110-1116.

Desroche N, Beltramo C, Guzzo J. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Microbiol Methods* 2005; 60:325-33.

Dlugonska, H. *Toxoplasma gondii* and the host cells. *Animals of Parasitology* 2014; 60:83-88.

Dourado I, Veras MASM, Barreira D, Brito AM. Tendências da epidemia de Aids no Brasil após a terapia anti-retroviral. *Rev Saúde Pública* 2006; 40:9-17.

Dressen, DW. *Toxoplasma gondii*. J Am Vet Med Assoc 1990; 196: 274-276.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exp Med 1970; 132: 636-62.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J Protozool. 1972; 19:155-77.

Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. J Protozool. 1976; 4:537-46.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1998; 28:1019-24.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. J Eukaryot Microbiol 2008; 55:467-75.

Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int. J. Parasitol. 2008; 38: 1257-1278.

Dubey JP. Toxoplasmoses of animals and humans. 2 ed. Boca Raton: CRC Press 2010a; p. 338.

Dubey, JP. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, clinical disease, diagnosis, and public health significance. Zoonoses and Public Health 2010b; 57: 60–73.

Dubey JP, Rajendran C, Costa DG, Ferreira LR, Kwok OC, Qu D, et al. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. J Parasitol. 2010; 96:709-12.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012; 139:1375-424.

Dukes C, Luft B, Durak D. Toxoplasmosis. In: Scheld WM, Whitley RJ, Durack DT. *Infectious of the central nervous system*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997; 785- 806.

Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31:e00057–17.

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; 33:2421-6.

Dwivedi Y. Emerging role of microRNAs in major depressive disorder: diagnosis and therapeutic implications. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014; 16:43-61.

Escobar TM, Kanellopoulou C, Kugler DG, Kilaru G, Nguyen CK, Nagarajan V, et al. miR-155 activates cytokine gene expression in Th17 cells by regulating the DNA-binding protein Jarid2 to relieve polycomb-mediated repression. *Immunity* 2014; 40: 865–879.

Evan M, Kroh A, Rachel K, Parkin A, Patrick S, Mitchell A et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50: 298–301.

Expósito-Rodrigues M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology* 2008; 8:131.

Falcone, G. A new role of mir-29c as a potent inducer of skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiologica* 2019; 226: e 13320.

Fialho CG, Teixeira MC, Araujo FAP. Toxoplasmose animal no Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae* 2009; 37: 1-23.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages indentified as coccidian oocysts. *Science* 1970; 167: 893-896.

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

Frenkel JK, Hassenem KM, Hassenem RS, Brown E, Thulliez P, Quintero-Nunez R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds and soil. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53: 458-468.

Freyre A, Choromanski L, Fishback JL, Popieel I. Immunization of cats' with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology* 1993; 79: 716-719.

Friedman JM, Jones PA. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss Med Wkly* 2009; 139: 466-472.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009; 19: 92-105.

Gantier MP, Sadler AJ, Williams BR. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85:458-62.

Gazzinelli RT, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol 1992; 149: 175-180.

Gazzinelli RT, Bala S, Stevens R, Baseler M, Wahl L, Kovacs J, Sher A. HIV Infection suppresses type 1 Lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma Gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines. J Immunol 1995; 155: 1565-1574.

Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar rnas commonly used for microrna normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. Br J Cancer 2011; 104:1168-77.

Ghai V, Wang K. Recent progress toward the use of circulating micrnas as clinical biomarkers. Arch. Toxicol. 2016; 90: 2959–2978.

Glinge C, Clauss S, Boddum K, Jabbari R, Jabbari J, Risgaard B, et al. Stability of circulating blood-based micrnaspre-analytic methodological considerations. Plos One 2017; 12:1–16.

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.

Greco SJ, Rameshwar P. MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104:15484-9.

Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. Cancer Res 2005; 65:3509-3512.

Ha M, Kim VN. Regulation of MicroRNA Biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15:509–524.

Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-beta and the IFN-gamma receptor. *J Immunol* 2005; 174:6781–6790.

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.

Hays, JP. The evaluation of putative endogenous control housekeeping genes for real-time polymerase chain reaction expression studies in *Moraxella catarrhalis* *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 65: 323-326.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004; 5:522-31.

He X, Tang R, Sun Y, Wang YG, Zhen KY, Zhang DM, Pan WQ. MicroRNA-146 Blocks the Activation of M1 Macrophage by Targeting Signal Transducer and Activator of Transcription 1 in Hepatic Schistosomiasis. *Ebiomedicine* 2016; 13:339–347.

Hernández-González E, Zamora F, Barnés J, Bender JE, Rodríguez-Delgado F, Millán-Marcelo JC. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis cerebral en pacientes cubanos con Sida. *Rev Neurol.* 2002; 34:618-21.

Hernandez AV, Thota P, Pellegrino D, Pasupuleti V, Benites-Zapata VA, Deshpande A, et al. A systematic review and meta-analysis of the relative efficacy and safety of treatment regimens for HIV-associated cerebral toxoplasmosis: is trimethoprim-sulfamethoxazole a real option? *HIV Medicine* 2017; 18:115-124.

Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infectious* 2002; 8: 634-640, 2002.

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

Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* as a Parasite in Food: Analysis and Control. *Microbiol Spectr.* 2016; 4:4.

Hu K, Johnson J, Florens L, Fraunholz M, Suravajjala S, Dilullo C, et al. Cytoskeletal Components of an Invasion Machine – The apical complex of *Toxoplasma gondii*, *Plos Pathogen* 2006; 2:2.

Hwang S, Khan IA. CD8⁺T cell immunity in an encephalitis model of *Toxoplasma gondii* infection. *Semin. Immunopathol.* 2015; 37: 271-279.

Israelki DM, Remington JS. Encefalite toxoplásmica em pacientes com AIDS. *Clin Doenças Infec Parasit Amer Norte* 1988; 2: 451-469.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, 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.

Jiang H, Zhang G, Wu JH, Jiang CP. Diverse roles of mir-29 in cancer (review). *Oncol. Rep.* 2014; 31: 1509–1516.

Jiang J, Yu C, Chen M, Zhang H, Tian S, Sun C. Reduction of mir-29c enhances pancreatic cancer cell migration and stem cell-like phenotype. *Oncotarget* 2015; 6: 2767–2778.

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

Jones JL, Kruszon-Moran D, Rivera HN, Price C, Wilkins PP. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the United States 2009-2010 and comparison with the past two decades. *Sou. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90: 1135 – 1139.

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science.* 2005; 309:1577-81.

Joseph P, 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; 40:4499-503.

Jost PJ, Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 2007; 109:2700–2707.

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.

Kanno Y, Vahedi G, Hirahara K, Singleton K, O'Shea JJ. Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu. Rev. Immunol* 2012; 30: 707–731.

Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol* 2005; 5:749–759.

Kawazoe, U. *Toxoplasma Gondii*. In: Neves D. P. *Parasitologia Humana*. 10 Ed. São Paulo: Atheneu, 2002; P. 147-156.

Kheirelseid EAH, Chang KH, Newell J, Kerin MJ, Miller N. Identification of endogenous control genes for normalization of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Mol Biol*, 2010 11:12.

Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes Infect* 2008; 10: 978-984.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10:126-39.

Körner H, McMorran B, Schlüter D, Fromm P. The role of TNF in parasitic Diseases: still more questions than answers. *Int J Parasitol* 2010; 40: 879-888.

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

Kumar P, Dezso Z, Mackenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, et al. Circulating mirna biomarkers for Alzheimer's disease. *Plos One* 2013; 8:e69807.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294:853-8.

Lee RC, Feinbaum RI, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75:843-54.

Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294:862-864.

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

Levine ND. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. *J Protozool* 1988, 35: 518-520.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120: 15-20.

Li L, Wang X, Li W, Yang L, Liu R, Zeng R, Wu Y, Shou T. mir-21 modulates prostaglandin signaling and promotes gastric tumorigenesis by targeting 15-PGDH. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018; 495: 928-934.

Li S, Yag J, Wang L, Du F, Zhao J, Fang R. Expression profile of micrnas in porcine alveolar macrophages after *Toxoplasma gondii* infection. *Parasit Vectors*. 2019 12:65.

Li T, Ding ZL, Zheng YL, Wang W. mir-484 promotes non-small-cell lung Cancer (NSCLC) progression through inhibiting Apaf-1 associated with the Suppression of apoptosis, *Biomed. Pharmacother* 2017; 96:153-164.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. *Methods*, 2001; 25:402-8.

Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H et al. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 1990; 61: 351–59.

Lopes-Ramos CM, Habr-Gama A, Quevedo Bde S, Felício NM, Bettoni F, Koyama FC, et al. Overexpression of mir-21-5p as a predictive marker for complete tumor regression to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *BMC Med Genomics*. 2014; 7:68.

Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of mir-146a in controlling T_{reg} cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*. 2010; 142:914–929.

Lu TX, Hartner J, Lim E-J, Fabry V, Mingler MK, Cole ET, et al., MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol*. 2011; 187:3362–73.

Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ *Nature Immunology*, 2011; 12: 861-869.

Majidinia M, Yousefi B. Long non-coding RNAs in cancer drug resistance development. *DNA Repair (Amst)* 2016; 45:25-33.

Mayer KH, Shisana O, Beyrer C. AIDS 2016: da aspiração à implementação *Lancet* 2016; 387:248- 2485.

McDermott AM, Kerin MJ, Miller N. Identification and validation of mirnas as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *Plos One* 2013; 8: e83718.

Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol* 2008; 57:845-50.

Meira CS, Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, de Mattos CC, Motoie G, Costa-Silva TA, et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- γ , TNF- α , and IL-10 levels. *Front Microbiol.* 2014; 5: 492.

Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol.* 2002; 168: 2988-96.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso. 8 a ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Ministério da Saúde. HIV AIDS 2018. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil: 2018 v.49.

Mitsuka-Breganó R, Lopes-Mori FMR, Navarro IT. Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: Vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas. Londrina: EDUEL; 2010.

Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis.* 2015; 35:3-11.

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

Montoya JG, Liesenfeld O, Kinney S, Press C, Remington, JS. VIDAS Test for Avidity of *Toxoplasma*-Specific Immunoglobulin G for Confirmatory Testing of Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology* Jul 2002, 40: 2504-2508.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004; 363:1965-76.

Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. Immunological Reviews 2011; 240: 269-285.

Muñoz-Zanzi CA, Fry P, Lesina B, Hill D. *Toxoplasma gondii* Oocyst-specific antibodies and source of infection. Emerg. Infect. Dis. 2010; 16:1591-1593.

Nascimento FS, Suzuki LA, Rossi CL. Assessment of the value of detecting specific iga antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. Prenatal Diagnosis 2008; 28: 749-752.

Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. Parasitologia Humana. 10a. Ed.: São Paulo: Ed. Atheneu; 2000 p. 428.

Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Ed. Atheneu 2004; 18:165-167.

Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (or organisms voisins) du *Gondi*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 1909; 147: 763-766.

O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. MicroRNA regulation of inflammatory responses. Annu Rev Immunol. 2012; 30: 295-312.

Oertli M, Engler DB, Kohler E, Koch M, Meyer TF, Muller A. MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic gastritis and colitis. J. Immunol. 2011; 187: 3578–3586.

Oliveira AA, Bevilacqua PD. Principais protozoários transmissíveis por produtos de origem animal. Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte 2004; n.43 p. 5- 14.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol*, 2009; 39: 1385-1394.

Parikh NI, Vasan RS. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. *Biomark Med* 2007; 1:419–436.

Park SK, Park YS, Ahn JY, Do EJ, Kim D, Kim JE, et al. Mir 21-5p as a predictor of recurrence in young gastric cancer patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016; 31:1429-1435.

Pashaei E, Pashaei E, Ahmady M, Ozen M, Aydin N. Meta-analysis of mirna expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy, *plos One* 2017; 12: e0179543.

Pellegrino D, Gryscek R, Oliveira ACP, Marcusso R, Correia A, Vidal JE. Efficacy and safety of trimethoprim-sulfamethoxazole in HIV-infected patients with cerebral toxoplasmosis in Brazil: a single-arm open-label clinical trial. *International Journal of STD & AIDS* 2019; 0:1-7.

Pereira P, Queiroz JÁ, Figueiras A, Sousa, F. Current Progress on MicroRNAs-Based Therapeutics in Neurodegenerative Diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2017; 8:1409.

Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol*, São Paulo. 2009, 4:1363-79.

Pinkerton H, Weinman RG. *Toxoplasma* infection in man. *Acta Pathol* 1940; 30: 374-92.

Pinto L, De Carli CM, Rodrigues BDÁ. Prevalência da toxoplasmose na medicina veterinária e sua importância como zoonose. Revisão – veterinária em foco. 2009; 7: 1.

Pittman KJ, Knoll LJ. Long-term relationships: the complicated interplay between the host and the developmental stages of *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infections. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015; 79: 387–401.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific micro-RNA regulates insulin secretion. Nature 2004; 432:226-230.

Prado AF, De Almeida GF, Gontijo LS, Torres LS. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer- Goiânia 2011; 7: 30.

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.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21- nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 2000; 403:901-6.

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

Remington JS, Klein J, Wilson CB, Baker MD. Infectious disease of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p.946-1091.

Rey L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. Parasitologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p. 274-285.

Rey L. Parasitologia, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Rice J, Roberts H, Rai SN, Galandiuk S. Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: A need for more precise standardization. *Surgery* 2015; 158: 1345-1351.

Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25: 264-96.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004; 14:1902-10.

Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007; 316: 608–611.

Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. microRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart* 2015; 101:921–928.

Rossi RL, Rossetti G, Wenandy L, Curti S, Ripamonti A, Bonnal RJ, et al. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4⁺ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol* 2011; 12:796–803.

Ruiz ML. A Novel Case of Solitary Cerebral Toxoplasmosis Mimicking Glioblastoma as the First Presentation of HIV. *J Clin Neurol.* 2016; 12: 248–250.

Saba R, Sorensen DL, Booth SA. MicroRNA-146a: a dominant, negative regulator of the innate immune response. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 578.

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.

Sayles PC, Gibson GW, Johnson LL. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 2000; 68: 1026-1033.

Schlosser K, McIntyre LA, White RJ, Stewart DJ. Customized Internal Reference Controls for Improved Assessment of Circulating microRNAs in Disease. *Plos ONE* 2015; 10: e0127443.

Schraml E, Hackl M, Grillari J. MicroRNAs and toxicology: a love marriage microRNAs in liquid biopsies are minimal-invasive. *Biomarkers for tissue-specific toxicity. Toxicology Reports* 2017; 4: 634-636.

Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 2006; 25:701–715.

Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA mir-21. *Nat Immunol* 2010; 11:141–147.

Sheppard HM, Verdon D, Brooks AE, Feisst V, Ho YY, Lorenz N et al. MicroRNA regulation in human CD8⁺ T cell subsets—cytokine exposure alone drives miR-146a expression. *J Transl Med*, 2014; 12:292.

Silva AV, Silva RC, Zamprogna TO, Lucas TM. *Toxoplasma gondii* in swine with emphasis on the Brazilian contribution. *Scientia Medica* 2010; 20: 120-130.

Silva JCR, Ferreira F, Dias RA, Ajzenberg D, Marvulo MFV, Magalhães FJR, et al. Cat-rodent *Toxoplasma gondii* Type II-variant circulation and limited genetic diversity on the Island of Fernando de Noronha, Brazil. *Parasit Vectors*. 2017; 10:220.

Silveira ED, Alves-Ferreira M, Guimarães LA, Silva FR, Carneiro VTC. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual Grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol* 2009; 9: 84.

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

Slota JA, Booth SA. Micrnas in Neuroinflammation: Implications in Disease Pathogenesis, Biomarker Discovery and Therapeutic Applications. *Non-coding RNA* 2019; 5: 35.

Song M-S, Rossi JJ. Molecular Mechanisms of Dicer: Endonuclease and Enzymatic Activity. *Biochem. J.* 2017; 474:1603–1618.

Stassen QE, Riemers FM, Reijmerink H, Leegwater PA., Penning LC, Reference genes for reverse transcription quantitative PCR in canine brain tissue. *BMC. Res. Notes* 2015; 8: 761.

Steiner D, Thomas M, Hu J, Yang Z, Babiarz J, Allen C, et al. MicroRNA-29 Regulates T-Box Transcription Factors and Interferon- γ Production in Helper T Cells *Immunity* 2011; 35: 169-181.

Souza JCF. *Microbiologia Porto: Lidel – In Ferreira, W. F, Edições Técnicas, Lda 2002; p. 420-425.*

Souza W, Martins Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Structure organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica* 2010; 1:131-143.

Stokowy T, Wojtas B, Jarzab B, Krohn K, Fredman D, Dralle H, et al. Two-mirna classifiers differentiate mutation-negative follicular thyroid carcinomas and follicular thyroid adenomas in fine needle aspirations with high specificity. *Endocrine* 2016; 54:440-447.

Suzuki Y, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. *Res Immunol* 1993; 144:66–67.

Tait ED, Hunter CA. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 201-210.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1217-1258.

Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007; 316: 604-608.

Torgerson PR, Macpherson CN. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Vet. Parasitol* 2011; 182: 79-95.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Controle da tradução e degradação do mRNA por miRNAs e siRNAs. *Genes Dev.* 2006; 20: 515-524.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 18:3.

Vargas MM, Stolf-Moreira R. Aplicação de microRNAs na prática clínica. *Rev Bras Clin Med.* 2013; 11:62-6.

Vidal JE, Colombo FA, Penalva De Oliveira AC.; Focaccia, R.; Pereira-Chioccia, V.L. 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, de Oliveira AC, Dauar RF, Barbosa SP Jr, 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.

Vidal JE, Diaz AVH, Penalva De Oliveira AC, Dauar RF, Colombo FA, Pereira-Chioccia VL. Importance of high igg anti-Toxoplasma gondii titers and PCR detection of *T. gondii* DNA in peripheral blood samples for the diagnosis of AIDS-related cerebral toxoplasmosis: a case-control study. *Braz J Infect Dis* 2011; 15: 356-359.

Vidal JE, Oliveira AC. AIDS-related cerebral toxoplasmosis in São Paulo State, Brazil: marked improvements in the highly active antiretroviral therapy-era but the challenges continue. *Braz J Infect Dis* 2013; 17: 379- 380.

Vidal JE. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2019; 18:2325958219867315.

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.

Wang H, Zhu Y, Zhao M, Wu C, Zhang P, Tang L, et al. Mirna-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin beta1 and matrix metalloproteinase2 (MMP2). *Plos One* 2013; 8: e70192.

Wang JK, Wang Z, Li G. Microrna-125 in immunity and cancer. *Cancer Letters* 2019; 454: 134-145.

Wang J-L, Zhang N-Z, Li T-T, He J-J, Elsheikha HM, Zhu X-Q. Advances in the Development of Anti-Toxoplasma gondii Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Trends in Parasitology* 2019; 35: 239-253.

Wang K, Long B, Jiao JQ, Wang JX, Liu JP, Li Q, et al. Mir-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1. *Nat Commun* 2012; 3:781.

Wang M, Guo J, Dong L, Wang J. Cerebellar Fastigial Nucleus Stimulation in a Chronic Unpredictable Mild Stress Rat Model Reduces Post-Stroke Depression by Suppressing Brain Inflammation via the microRNA 29c/TNFRSF1A Signaling Pathway. *Med Sci Monit*, 2019; 25: 5594-5605.

Wang Z, Cai Q, Jiang Z, Liu B, Zhu Z, Li C. Prognostic role of microrna-21 in gastric cancer: a meta-analysis. *Med Sci Monit*. 2014; 20: 1668- 1674.

Wang Z, Brandt S, Medeiros A, Wang S, Wu H, Dent A, Serezani CH. miR-21 Is a Homeostatic Regulator of Macrophage Polarization and Prevents Prostaglandin E₂-Mediated M2 Generation. *Plos ONE* 2015; 10: e0115855.

Wechsler B, Du LTH, Vignes B, Piette JC, Chomette G, Godeau P. Toxoplasmose et lupus revue de la littérature à propos de 4 observations. *Ann Méd Interne*. 1986; 137:324–30.

Wei B, Pei G. MicroRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cell Mol Immunol*. 2010; 7:175–81.

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

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006; 103:4034-4039.

Xia X, Teotia P, Ahmad I. Mir-29c regulates neurogliogenesis in the mammalian retina through REST. *Developmental Biology* 2019; 450: 90–100.

Yang L, Boldin MP, Yu Y, Liu CS, Ea C, Ramakrishnan P, et al. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J. Exp. Med* 2012 209: 1655-1670.

Yenilmez E, Çetinkaya RA. Difference in *Toxoplasma gondii* Seroprevalence Rates Due to Low and High CD4 Counts in Patients with HIV/AIDS. *Turkiye Parazitoloj Derg*. 2019; 43(1):Suppl 1:1-7.

Zearo S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG, et al. miR-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer* 2014;14:200.

Zhao X, Li J, Huang S, Wan X, Luo H, Wu D. Mirna-29c regulates cell growth and invasion by targeting CDK6 in bladder cancer. *American journal of translational Research* 2015; 7: 1382-1389.

Zhou H, Huang J, Murthy KS. Molecular cloning and functional expression of a VIP-specific receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006; 291: G728–34.

Zhu E, Wang X, Zheng B, Wang Q, Hao J, Chen S et al. miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting ROR γ t and STAT3. *J Immunol*, 2014; 192: 5599-5609.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão gênica de citocinas e miRNA na toxoplasmose cerebral

Pesquisador: Cristina da Silva Meira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40236414.5.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.020.582

Data da Relatoria: 19/03/2015

Apresentação do Projeto:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 03 de fevereiro de 2015.

Objetivo da Pesquisa:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 03 de fevereiro de 2015 sem alterações

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 03 de fevereiro de 2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Comentários com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 03 de fevereiro de 2015.

O projeto aborda a ocorrência de doenças oportunistas em pacientes com AIDS, mais especificamente, a ocorrência de toxoplasmose cerebral. A resposta imune de pacientes frente ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um processo complexo. O curso da doença é progressivo, com ocorrência de infecções oportunistas, que ocorrem secundariamente à grande destruição de populações de linfócitos T CD4+, comprometendo a habilidade de o sistema imune responder adequadamente, surgindo assim as infecções oportunistas. A introdução da terapia antirretroviral altamente eficaz-HAART reduziu a incidência das infecções oportunistas, contudo, essas doenças continuam sendo muito frequentes. Segundo os autores, em um estudo recente

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.248-902
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3085-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: copial@lal.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.020.502

realizado no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, a ocorrência da toxoplasmose cerebral é registrada em 46% dos casos de pacientes internados por complicações neurológicas e que haviam recebido o tratamento prévio de HAART. Na introdução do projeto os autores, por meio de referências bibliográficas, justificam o investimento e a relevância de estudos que melhorem o rápido diagnóstico e tratamento da AIDS e das doenças oportunistas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Análise com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 03 de fevereiro de 2015, e nas respostas às pendências.

1. TCLE

Conteúdo e procedimento de obtenção/aplicação, de acordo com as exigências da Resolução CNS 466/2012.

2. Termo de anuência do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

Documento apresentado e de acordo.

Recomendações:

Análise com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 03 de fevereiro de 2015.

O Título do projeto de pesquisa foi mantido.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas no parecer consubstanciado do CEPIAL de 03 de fevereiro de 2015.

1. Esclarecer onde serão realizadas as coletas de amostras dos pacientes e como serão selecionados.

ATENDIDA.

Esta informação é apresentada de maneira sucinta apenas no ofício do acordo de colaboração, mas não é citado no corpo do projeto apresentado.

Foi acrescentado no corpo do projeto que os pacientes serão procedentes do atendimento do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e selecionados pelo profissional do IIER, o qual também será responsável pela obtenção/aplicação do TCLE.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3085-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@lal.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.020.682

3. Esclarecer como serão selecionados os pacientes dos três grupos que irão participar do projeto. Pelos critérios de inclusão apresentados, não estão inclusos os 15 pacientes do grupo III (controle). Definir melhor critérios de inclusão dos pacientes do grupo II. ATENDIDA.

Foram redefinidos os grupos, havendo agora dois grupos de 30 pacientes cada: um composto de pacientes com AIDS e toxoplasmose cerebral, e o segundo grupo (grupo controle) pacientes com AIDS e toxoplasmose cerebral negativa.

3. Definir com mais detalhes como será aplicado o TCLE. Qual profissional da equipe irá participar/acompanhar a aplicação deste TCLE.

ATENDIDA.

4. Rever o TCLE para que contenha todas as informações e esclarecimentos a todos pacientes que irão participar do projeto. O TCLE não está apresentado de forma clara, pois cita que serão necessários 30 pacientes com toxoplasmose cerebral, sendo que a proposta apresentada no projeto contempla três grupos de pacientes: - com toxoplasmose cerebral e AIDS; - pacientes com toxoplasmose e - pacientes soronegativos para toxoplasmose e HIV.

ATENDIDA.

Foram redefinidos os grupos, e então o TCLE foi alterado de modo que agora apresenta as informações necessárias aos dois grupos.

5. Alterar a citação da Resolução CNS 196/96 que foi substituída pela Resolução CNS 466/2012.

ATENDIDA.

6. Apresentar Termo de Anuência assinado pela direção do IIER e não apenas pelo pesquisador que irá participar do projeto.

ATENDIDA.

Foi apresentado termo de anuência assinado pelo pesquisador participante e pelo diretor do IIER.

7. No cronograma alterar a data de início das coletas uma vez que está registrado dia 05 de janeiro de 2015.

ATENDIDA.

A data foi alterada para 01 de abril de 2015.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3066-2059

Fax: (11)3065-3505

E-mail: ceplat@lal.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.020.582

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL em reunião ordinária de 19 de março de 2015.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2858

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@lal.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.020.502

SAO PAULO, 13 de Abril de 2015

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3ª andar - Sala 90
Bairro: Conquista César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: ospial@al.sp.gov.br