

**Cristina da Silva Meira**

**Antígenos excretados/secretados de *Toxoplasma gondii*: resposta imune celular e humoral na toxoplasmose cerebral e Aids**

Tese 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 Doutor em Ciências.

**Área de Concentração:**

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

**Orientadora:**

Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola

**SÃO PAULO  
2013**

#### FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Meira, Cristina da Silva

Antígenos excretados/secretados de *Toxoplasma gondii*: resposta imune celular e humoral na toxoplasmose cerebral e Aids / Cristina da Silva Meira – São Paulo, 2013.

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

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

1. Toxoplasma      2. Toxoplasmose cerebral      3. Antígenos  
4. Imunidade humoral    5. Imunidade celular    6. Síndrome de  
imunodeficiência adquirida

SES/CCD/CD-270/12

*Dedico este trabalho aos meus pais, Aderito (in memoriam) e Vera Lúcia,  
por terem dado tudo de si pela minha formação intelectual e moral;  
e por acreditarem em minhas lutas e compreenderem minha ausência em  
momentos importantes. Registro aqui toda a minha gratidão, em especial ao  
meu pai, um dos meus grandes incentivadores (e o mais exigente).  
Sinto que de alguma forma ele está orgulhoso e feliz com mais esta conquista.  
Agradeço minha mãe pela fortaleza que é e por ter me dado força para seguir  
em frente quando o caminho pareceu sem sentido.  
Para mim, um exemplo de mãe, esposa e mulher.  
Amo muito vocês, sempre!*

## *AGRADECIMENTO ESPECIAL*

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola**, pela valiosa e dedicada orientação durante o decorrer desta Tese. Agradeço pelos conselhos, paciência e por tudo aquilo que com primoroso carinho e seriedade você me ensinou. Obrigada Vera, por permitir meu ingresso na pesquisa e me fazer crescer, despertando em mim a vocação que seguirei por toda a vida. Embora o que escrevo aqui não exprima em totalidade minha gratidão, deixo aqui, os meus mais sinceros e carinhosos agradecimentos a você, a quem admiro e respeito pelo exemplo de competência e entusiasmo que é.

## AGRADECIMENTOS

Às minhas queridas irmãs, **Fabiana e Malena**, pela paciência, compreensão e amor e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Amo vocês e sou muito feliz pela família que somos.

Ao meu noivo **Diego**, pelo amor, dedicação e paciência e por me incentivar sempre a continuar e torcer pelo meu sucesso profissional. Agradeço pelo companheirismo e apoio nos momentos mais difíceis ao longo deste trabalho e por me fazer acreditar que *“tudo vai dar certo”*. Agora sim, podemos casar!

Ao **Prof. Dr. José Ernesto Vidal**, pela grande parceria oferecida entre o Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e Instituto Adolfo Lutz, por viabilizar este trabalho e recrutar os residentes a fazerem parte deste projeto. Agradeço também pela amizade e sugestões dadas ao longo deste e outros estudos já realizados.

Aos residentes do IIER, **Daniel Soares S. Dantas, Munir Bazzi, Tatiana Batista, Maria J.O. Kassab, Daniele S. Audi, Marianna M. Lago, Adriana Weinfeld, Vanessa L. Strolow, Aline S. Ibanez, Daniel P. Calili, Daniel P. Prestes, Carlos H. V. Moreira e Carlos Henrique** pela inclusão e acompanhamento dos pacientes, além das coletas realizadas e pelo empenho em concluir este trabalho. Sem eles, não conseguiríamos.

À **Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti** (FM-USP), **Profa. Dra. Adele Caterino de Araújo** (IAL), **Profa. Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman** (IMT-USP), **Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr** (IMT-USP) e **Prof. Dr. José Ernesto Vidal** (IIER), integrantes da banca de qualificação e defesa, pelas sugestões oferecidas para o enriquecimento deste trabalho.

Às minhas amigas-irmãs **Gabriela Motoie, Isabelle Martins e Thaís Alves** (em ordem alfabética), pelo convívio, companheirismo e por compartilharem

todos os momentos deste projeto. Obrigada pela valiosa amizade e agradeço a oportunidade de me juntar a vocês em todos estes anos. Torço muito por vocês sempre.

Ao meu grande amigo, **Fábio Antônio Colombo**, pela amizade e dicas importantes dadas ao longo dos anos, desde o início do aprimoramento e, principalmente, por poder contar sempre com sua ajuda, mesmo agora estando longe.

Às minhas amigas **Amanda Roseli** e **Carolina Matos**, pelo apoio e compreensão nesta etapa da minha vida. Obrigada por festejar as minhas conquistas e ouvir meus desabaços. Tenham a certeza de que vocês estão no meu coração.

Aos meus amigos do laboratório de biologia molecular e parasitologia, **Cida Perez, Margarete Pereira, Jefferson Rodrigues, Ricardo Gava, Ricardo Zana, Kate Bastos, Lázaro Teixeira, Inara Bastos, Alexandre e Marilena dos Anjos**, pela amizade e momentos de descontração e principalmente pelas *“gargalhadas nossas de cada dia”*.

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

Aos funcionários e aprimorandos do Centro de Parasitologia e Micologia do 8º andar do Instituto Adolfo Lutz, que contribuíram direta e indiretamente em minha formação acadêmica, pela ajuda, amizade e incentivo.

À Deus

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- 2011/13939-8).

Cristina da Silva Meira teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2009/09168-6).

*"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

O presente estudo avaliou alguns aspectos da resposta imune celular e humoral na co-infecção toxoplasmose cerebral e Aids (TC/Aids). O primeiro passo foi aperfeiçoar a produção de dois antígenos que foram utilizados em todos os experimentos. Um deles foi o antígeno lisado de taquizoítos (ALT) e o outro, um grupamento de antígenos excretados/secretados (ESA) obtidos dos sobrenadantes de culturas de células VERO, sem soro fetal bovino infectadas com taquizoítos. A seguir foram avaliados os níveis de IgG anti-*T. gondii* no líquido cefalorraquidiano (LCR) de 99 pacientes com TC/Aids. Em ambos os ensaios (ELISA e Western Blotting), ESA desencadeou reatividade nas amostras desses pacientes, o que não foi observado com o ALT. Concomitantemente, foi padronizado a ELISA, empregando ambos os antígenos, para a detecção de subclasses de IgG em 265 amostras de soro e 270 amostras de LCR. Os grupos de soros foram compostos de 58 pacientes TC/Aids; 49 com Aids/outras neuroinfecções/positivos para toxoplasmose; 58 com Aids/outras neuroinfecções/negativos para toxoplasmose; 50 indivíduos soropositivos para toxoplasmose e 50 indivíduos saudáveis. Os de LCR foram compostos conforme a presença ou não de toxoplasmose ativa sendo: 99 pacientes com TC/Aids; 112 com outras neuroinfecções/soropositivos para toxoplasmose e 59 com outras neuroinfecções/sorologia negativa para toxoplasmose. Somente com ESA obtivemos uma diferenciação no perfil de subclasses de IgG, onde níveis de IgG4 só foram detectados nos pacientes com TC/Aids, e a presença de IgG2 predominou nos indivíduos cronicamente infectados. O valor diagnóstico das IgA e IgE na TC/Aids foi também avaliado. Os resultados mostraram que não foi possível correlacionar tais anticorpos com a reativação da infecção.

A resposta imune celular na TC/Aids foi parcialmente avaliada estudando-se os níveis de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 e IL-4) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de 15 pacientes com TC/Aids. Tais pacientes apresentaram deficiência na

produção de IFN- $\gamma$ , altos níveis de TNF- $\alpha$  e uma pequena produção de IL-10 em comparação com os outros grupos de pacientes. O monitoramento da produção destas citocinas durante a evolução do tratamento específico para *T. gondii* mostrou que no 15<sup>o</sup> dia os pacientes já apresentam uma discreta produção de IFN- $\gamma$  e uma diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10. Não foi possível detectar IL-12 e IL-4 nos grupos estudados. Estes achados sugerem que baixos níveis de IFN- $\gamma$  estão correlacionados à redução e/ou deficiência na capacidade células TCD4<sup>+</sup> de pacientes com TC/Aids em produzir tal citocina, bem como altos níveis de TNF- $\alpha$  refletem a alta resposta inflamatória desencadeada pelo parasita. Em contrapartida, a presença de IL-10 sugere um efeito imunoregulatório nos indivíduos cronicamente infectados e naqueles negativos para toxoplasmose, porém uma suscetibilidade à infecção nos pacientes com TC/Aids, uma vez que tal citocina esta associada com um aumento da suscetibilidade a infecção, decorrente da deficiência no número de células TCD4<sup>+</sup>.

## ABSTRACT

The present study evaluated some aspects of humoral and cellular immune response in the co-infection cerebral toxoplasmosis and AIDS (CT/AIDS). The first step was to improve the production of two antigens that were used in all experiments. One was the tachyzoite lysate antigen (TLA) and the other was a group of excreted/secreted antigens (ESA) obtained from culture supernatants of VERO cells without fetal calf serum and infected with tachyzoites. Then, anti-*T. gondii* IgG levels in cerebrospinal fluid (CSF) of 99 TC/AIDS patients were evaluated. In both methodologies (ELISA and Western blotting), ESA triggered reactivity in samples from TC/AIDS patients, which were not observed using TLA. Concomitantly, methodologies employing ELISA and two antigens for IgG subclasses detection in serum and CSF samples were standardized. The assays were performed in 265 sera and 270 CSF samples composed of 58 sera (patients with CT/AIDS); 49 sera (patients with AIDS/other neuroinfections/positive toxoplasmosis); 58 sera (patients with AIDS/other neuroinfections/negative toxoplasmosis); 50 sera (individuals with asymptomatic toxoplasmosis/negative HIV); 50 sera (healthy individuals/negative toxoplasmosis and HIV); 99 CSF samples (patients with CT/AIDS); 112 CSF samples (patients with AIDS/other neuroinfections/positive toxoplasmosis); and 59 CSF samples (patients with AIDS/other neuroinfections/ negative toxoplasmosis). Only ESA was able to differentiate the IgG subclasses profile. IgG4 levels were detected only in TC/AIDS patients, and IgG2 levels were predominate in chronically infected patients. The diagnostic value of IgA and IgE in TC/AIDS patients was also evaluated. The results showed that it was not possible correlating these antibodies with the infection reactivation.

The cellular immune response of TC/AIDS patients was partially evaluated considering the cytokine levels (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 e IL-4) in supernatants from cultures of peripheral blood mononuclear cells. CT/AIDS patients showed deficiency in IFN- $\gamma$ , high TNF- $\alpha$  levels and small IL-10 levels, when compared with patients of other groups. The monitoring of

the production of these cytokines, during the specific *T. gondii* treatment, showed that after 15 days, patients already were able to produce small IFN- $\gamma$  levels. At the same time, TNF- $\alpha$  and IL-10 levels were decreased. IL-12 and IL-4 levels were not detected in studied groups. These findings suggest that low IFN- $\gamma$  levels are closely correlated to the reduction and/or deficiency in the ability CD4<sup>+</sup> T cells of TC/AIDS patients in producing this cytokine, as well as high levels of TNF- $\alpha$  reflect the high inflammatory response triggered by parasite. In contrast, IL-10 production suggests an immune-regulatory effect in chronically infected individuals and those negative for toxoplasmosis, but an infection susceptibility in CT/AIDS patients, since IL-10 is associated with an increased susceptibility to infection, caused by deficiency of CD4<sup>+</sup> T cells.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Aids** – “Acquired Immunodeficiency Syndrome” (Síndrome da imunodeficiência adquirida)
- ALT** – Antígeno lisado de taquizoítos
- CD4+** - “Cluster of Differentiation” (Grupamento de diferenciação 4)
- CD8+** - “Cluster of Differentiation” (Grupamento de diferenciação 8)
- CDC** – “Centers for Disease Control and Prevention”
- Células NK** – Células “Natural Killer”
- Células VERO** – Células de rim de macaco verde africano
- DNA** - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
- D.O.** - Densidade ótica
- DP** – Desvio padrão
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGF** – Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)
- ELISA** – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (Ensaio imunoenzimático)
- ESA** – Excreted/secreted antigens (Antígenos excretados/secretados)
- ESA-ELISA** – Ensaio imunoenzimático com ESA
- et al.** – e colaboradores
- g** – Aceleração da gravidade terrestre ( $9,8\text{m/s}^2$ )
- GM-CSF** - Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
- GPIs** – Pontes de glicosilfosfatidilinositol
- GRA** – Dense granules proteins (Proteínas dos grânulos densos)
- HAART** – “Highly active antiretroviral therapy” (Terapia anti-retroviral altamente eficiente)
- HIV** – “Human immunodeficiency vírus” (Vírus da imunodeficiência humana)
- IFN- $\gamma$**  - Interferon gamma
- IgA** - Imunoglobulina da classe A
- IgE** - Imunoglobulina da classe E

**IgG** - Imunoglobulina da classe G  
**IgM** - Imunoglobulina da classe M  
**IL** - Interleucina  
**LCR** - Líquido cefalorraquidiano  
**MIC** - Micronemal proteins (Proteínas dos micronemas)  
**mg** - miligrama (s)  
**mL** - mililitro (s)  
**mRNA** - RNA mensageiro  
**MOI** - Multiplicidade de infecção  
**OPD** - Orto-fenilenodiamina  
**PBS** - Solução salina tamponada com fosfato  
**PCR** - "Polimerase chain reaction" (Reação em cadeia da polimerase)  
**pH** - Concentração de hidrogênio iônico  
**RIFI** - Reação de imunofluorescência indireta  
**ROP** - Rhoptry proteins (Proteínas das roptrias)  
**SAG** - Surface antigen (Antígeno de superfície)  
**SDS-PAGE** - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
(Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio)  
**SFB** - Soro fetal bovino  
**SNC** - Sistema nervoso central  
**SRS** - Sequências relacionadas à SAG  
**TC** - Tomografia computadorizada  
**TC/Aids** - Toxoplasmose cerebral e Aids  
**TGF-β** - Transforming growth factor-beta (Fator beta transformador de crescimento)  
**Th1** - resposta celular do tipo 1  
**Th2** - resposta celular do tipo 2  
**TNF-α** - Tumor necrosis factor-alpha (Fator de necrose tumoral alfa)  
**UV** - Ultravioleta  
**VR** - Valor Relativo  
**μl** - microlitro

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Página

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Análise estatística das diferenças entre os grupos baseada nos resultados de ELISA utilizando ALT e ESA..... | 69 |
| <b>Figura 1.</b> Taquizoítos (A), cisto com bradizoítos (B) e oocisto esporulado e não esporulado (C).....                    | 24 |
| <b>Figura 2.</b> Vias de transmissão de <i>T. gondii</i> .....  | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Taquizoíto de <i>T. gondii</i> , ilustrando suas estruturas e organelas....                                  | 39 |
| <b>Figura 4.</b> Modelo integrado de invasão por <i>T. gondii</i> .....   | 40 |
| <b>Figura 5 – ELISA:</b> Reatividade imunológica ao antígeno ALT (A) e ESA (B) utilizando amostras de LCR.....                | 68 |
| <b>Figura 6 – Western Blotting:</b> Reatividade imunológica ao antígeno ALT (A) e ESA (B) utilizando amostras de LCR.....     | 70 |
| <b>Figura 7 – ELISA:</b> Reatividade de anticorpos subclasses de IgG frente ao antígeno ALT em amostras de soros.....         | 73 |
| <b>Figura 8 – ELISA:</b> Reatividade de anticorpos subclasses de IgG frente ao antígeno ESA em amostras de soros.....         | 74 |
| <b>Figura 9 – ELISA:</b> Reatividade de anticorpos subclasses de IgG frente ao antígeno ALT em amostras de LCR.....           | 75 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 10</b> – ELISA: Reatividade de anticorpos subclasses de IgG frente ao antígeno ESA em amostras de LCR.....  | 76 |
| <b>Figura 11</b> – ELISA: Produção de IFN- $\gamma$ (A), TNF- $\alpha$ (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de culturas de PBMC estimulados com PHA.....                                | 79 |
| <b>Figura 12</b> – ELISA: Produção de IFN- $\gamma$ (A), TNF- $\alpha$ (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de culturas de PBMC estimulados com ALT.....                                | 82 |
| <b>Figura 13</b> – ELISA: Produção de IFN- $\gamma$ (A), TNF- $\alpha$ (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de culturas de PBMC estimulados com ESA.....                                | 83 |
| <b>Figura 14</b> – ELISA: Produção de IFN- $\gamma$ (A), TNF- $\alpha$ (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de culturas PBMC de pacientes com TC/Aids provenientes de três coletas..... | 85 |

## ÍNDICE

página

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 22 |
| 1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....   | 22 |
| 1.2. Ciclo biológico.....   | 25 |
| 1.3. Epidemiologia da toxoplasmose.....   | 26 |
| 1.4. Toxoplasmose humana.....   | 27 |
| 1.4.1. Toxoplasmose em imunocompetentes.....  | 28 |
| 1.4.2. Toxoplasmose ocular.....   | 28 |
| 1.4.3. Toxoplasmose congênita.....  | 29 |
| 1.4.4. Toxoplasmose adquirida ou reativada em indivíduos<br>imunocomprometidos..... | 30 |
| 1.4.4.1. Toxoplasmose cerebral e Aids.....  | 30 |
| 1.4.4.2. Epidemiologia da toxoplasmose cerebral e Aids.....                         | 31 |
| 1.5. Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose.....                                  | 32 |
| 1.5.1. Diagnóstico da toxoplasmose cerebral.....                                    | 34 |
| 1.6. Antígenos de superfície de <i>T. gondii</i> .....                              | 38 |
| 1.7. Invasão celular e organelas secretórias.....                                   | 39 |
| 1.7.1. Micronemas.....  | 41 |
| 1.7.2. Roptrias.....  | 42 |
| 1.7.3. Grânulos Densos.....   | 43 |
| 1.8. Resposta imunológica na toxoplasmose .....                                     | 44 |
| 1.8.1. Resposta imunológica na toxoplasmose cerebral .....                          | 46 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 51 |
| 2.1. Objetivo geral.....  | 51 |
| 2.2. Objetivos específicos.....   | 51 |

|   |    |
|---|----|
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                         | 52 |
| 3.1. Delineamento experimental.....                         | 52 |
| 3.2. Pacientes.....   | 53 |
| 3.2.1. Para experimentos de resposta imune humoral .....    | 53 |
| 3.2.1.1. Amostras de soros.....                             | 53 |
| 3.2.1.2. Amostras de LCR .....                              | 53 |
| 3.2.2. Para experimentos de resposta celular.....           | 53 |
| 3.2.2.1. Amostras de sangue.....                            | 53 |
| 3.2.3. Critérios diagnósticos da toxoplasmose cerebral..... | 54 |
| 3.2.4. Obtenção das amostras.....                           | 55 |
| 3.2.4.1. Amostras de soros e LCR.....                       | 55 |
| 3.2.4.2. Amostras de sangue.....                            | 55 |
| 3.2.5. Considerações éticas.....                            | 56 |
| 3.3. Animais experimentais e <i>T. gondii</i> .....         | 56 |
| 3.3.1. Manutenção e obtenção dos parasitas .....            | 56 |
| 3.3.2. Cultura de células.....                              | 56 |
| 3.4. Produção de antígenos.....                             | 57 |
| 3.4.1. Padronizações.....                                   | 57 |
| 3.4.2. ALT.....   | 57 |
| 3.4.3. ESA.....   | 58 |
| 3.4.4. Dosagem proteica.....                                | 58 |
| 3.4.5. Eletroforese vertical das proteínas.....             | 58 |
| 3.5. Ensaio imunológico.....                                | 59 |
| 3.5.1. Para resposta imune humoral.....                     | 59 |
| 3.5.1.1. ELISA.....   | 59 |
| 3.5.1.1.1. Padronizações.....                               | 60 |
| 3.5.1.1.1.1. Para detecção de anticorpos IgG no LCR.....    | 60 |
| 3.5.1.1.1.2. Para detecção de anticorpos IgA e IgE.....     | 61 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.1.1.1.3. Para detecção de subclasses de IgG.....  | 61        |
| 3.5.1.2. Western blotting.....  | 61        |
| 3.5.2. Para resposta imune celular.....   | 62        |
| 3.5.2.1. Isolamento das PBMC.....   | 62        |
| 3.5.2.2. Cultura e estímulos das PBMC.....  | 63        |
| 3.5.2.3. ELISA para detecção de citocinas .....   | 63        |
| 3.5.3. Análise de dados.....  | 64        |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>   | <b>66</b> |
| 4.1. Otimização da produção <i>in vitro</i> da cepa RH de <i>T. gondii</i> em células VERO.....   | 66        |
| 4.2. Reatividade de anticorpos IgG em amostras de LCR de pacientes com toxoplasmose cerebral e Aids frente aos antígenos ALT e ESA..... | 67        |
| 4.2.1. ELISA.....   | 67        |
| 4.2.2. Western Blotting.....  | 70        |
| 4.3. Subclasses de IgG em amostras de soro e LCR envolvidas na infecção.....  | 71        |
| 4.4. Reatividade de anticorpos IgA e IgE em amostras de soro envolvidas na infecção.....  | 77        |
| 4.5. Produção de citocinas.....   | 78        |
| 4.5.1. Estímulos de PBMC, padronizações .....   | 78        |
| 4.5.2. Detecção de citocinas.....   | 80        |
| 4.5.2.1. IFN- $\gamma$ .....  | 80        |
| 4.5.2.2. TNF- $\alpha$ .....  | 80        |
| 4.5.2.3. IL-10.....   | 81        |
| 4.5.2.4. IL-4 e IL-12.....  | 81        |
| 4.5.3. Monitoramento dos níveis de citocinas dos pacientes com TC/Aids durante o tratamento.....  | 84        |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>86</b> |

|   |     |
|---|-----|
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....  | 101 |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 102 |
| <b>8. ANEXOS</b> .....  | 140 |
| <b>Anexo 1-</b> Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.....   | 140 |
| <b>Anexo 2-</b> Parecer da Comissão Científica do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.....   | 141 |
| <b>Anexo 3-</b> Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.....   | 142 |
| <b>Anexo 4-</b> Parecer do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz.....  | 143 |
| <b>Anexo 5-</b> Prêmio de Honra ao Mérito na Área de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública do VIII Encontro do Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD, da Secretaria de Estado da Saúde – São Paulo/SP, em 2012.....  | 144 |
| <b>Anexo 6</b> - Carta de Informações ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....   | 145 |
| <b>Anexo 7</b> – Meira CS, Vidal JE, Costa-Silva TA, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chioccola VL. Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV-infected patients using <i>Toxoplasma gondii</i> excreted/secreted antigens. <i>Diag Microbiol Infect Dis</i> 2011; 71: 279-285..... | 147 |
| <b>Anexo 8</b> – Costa-Silva TA, Meira CS, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chioccola VL. <i>Toxoplasma gondii</i> antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in sérum free médium. <i>Exp Parasitol</i> 2012; 130: 463-469.....   | 148 |

**Anexo 9** – Meira CS, Vidal JE, Costa-Silva TA, Motoie G, Gava R, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients: Profile of humoral immune response and potential diagnostic use of IgG4 levels in sérum and/or cerebrospinal fluid. Em submissão no periódico J Immun Methods.....149

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Toxoplasma gondii*

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

O parasita invade e se multiplica no interior de célula nucleadas de mamíferos e de vários outros animais de sangue quente (Carruthers, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004; Dubey, 2008). Parasitam de preferência macrófagos teciduais, mas são encontrados também em secreções, células endoteliais, nervosas e musculares, apresentando assim, uma morfologia múltipla, dependendo do habitat e do estado evolutivo. Há três estágios infectantes de *T. gondii*: os taquizoítos (livres), os bradizoítos (em cistos teciduais) e os esporozoítos (em oocistos) (Dubey, 2008; Innes, 2010). Essas três formas apresentam organelas citoplasmáticas características do

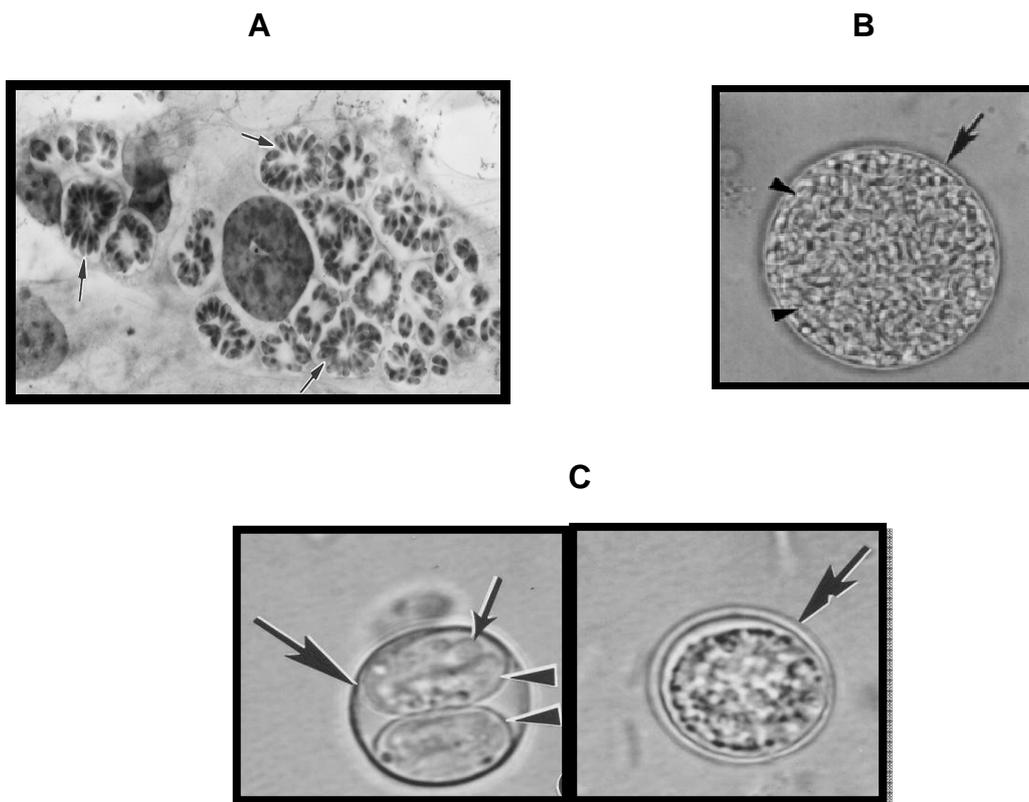
filo Apicomplexa que constituem o complexo apical: conóide, anéis polares, microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos (Soldati e Meissner, 2004; Dubey, 2008).

Os taquizoítos (Figura 1A) são formas de multiplicação rápida em quaisquer células do hospedeiro intermediário e nas células do epitélio intestinal do hospedeiro definitivo, presentes em grande número nas infecções agudas. Apresentam formato de meia lua e medem cerca de 6  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2  $\mu\text{m}$  de largura. Entram na célula hospedeira por penetração ativa e após a entrada, se tornam ovóides e envoltos por um vacúolo parasitóforo, o qual se acredita ser derivado de moléculas do parasita e da célula hospedeira (Hill et al., 2005). No interior do vacúolo parasitóforo, os taquizoítos se encontram protegidos dos mecanismos de defesa da célula (Dubey, 2008). Multiplicam-se assexuadamente dentro da célula hospedeira por repetidas endodiogênias até a ruptura celular. Este processo continua até o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro frente ao parasita (Hill et al., 2005; Dubey, 2008; Blader e Saeij, 2009).

A infecção é estabelecida após algumas divisões. A seguir, os parasitas formam cistos teciduais, de aproximadamente 5 a 70  $\mu\text{m}$  de diâmetro, podendo chegar a 300  $\mu\text{m}$  com centenas de bradizoítos em seu interior (Figura 1B) (Dubey, 1998; Innes, 2010). Estes se alojam no interior dos tecidos por longos períodos ou pela vida toda do hospedeiro, sem que cause resposta inflamatória ou dano tecidual significativo. São morfológicamente idênticos aos taquizoítos, exceto pela multiplicação mais lenta, pela localização do núcleo na parte posterior do parasita e por numerosos micronemas e grânulos de amilopectina. Medem cerca de 7  $\mu\text{m}$  por 1,5  $\mu\text{m}$  e são mais resistentes a enzimas proteolíticas do que os taquizoítos. Estas formas estão presentes nas infecções crônicas e congênicas e, embora cistos teciduais contendo bradizoítos possam se desenvolver no pulmão, fígado e rim, são mais prevalentes em tecidos neurais e musculares (cérebro, coração, músculo esquelético e retina) (Hill et al., 2005). A variação no tamanho depende do estágio do cisto, da célula

hospedeira parasitada e do número de bradizoítos em seu interior (Weiss e Kim, 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Os oocistos são formas resultantes do ciclo sexuado e somente ocorrem no trato gastrointestinal dos felídeos com primo-infecção. Medem em torno de 10  $\mu\text{m}$  por 12  $\mu\text{m}$  e são eliminados pelas fezes dos gatos ainda não esporulados (Figura 1C). São as formas de resistência no meio ambiente e tornam-se infectantes após a esporulação que ocorre de três a cinco dias de acordo com as condições ambientais. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos que abrigam em seu interior quatro esporozoítos cada. Os esporozoítos medem, em média, cerca de 6  $\mu\text{m}$  por 2  $\mu\text{m}$ . Os oocistos esporulados podem permanecer viáveis no meio ambiente por um período de até 18 meses (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004; Kravetz e Federman, 2005).



**Figura 1.** Taquizoítos em fibroblastos humanos (A). Cisto contendo bradizoítos proveniente de macerado de cérebro de camundongo infectado (B). Oocisto esporulado e não esporulado de amostras de fezes de gato (C).

Fonte: Hill et al., 2005.

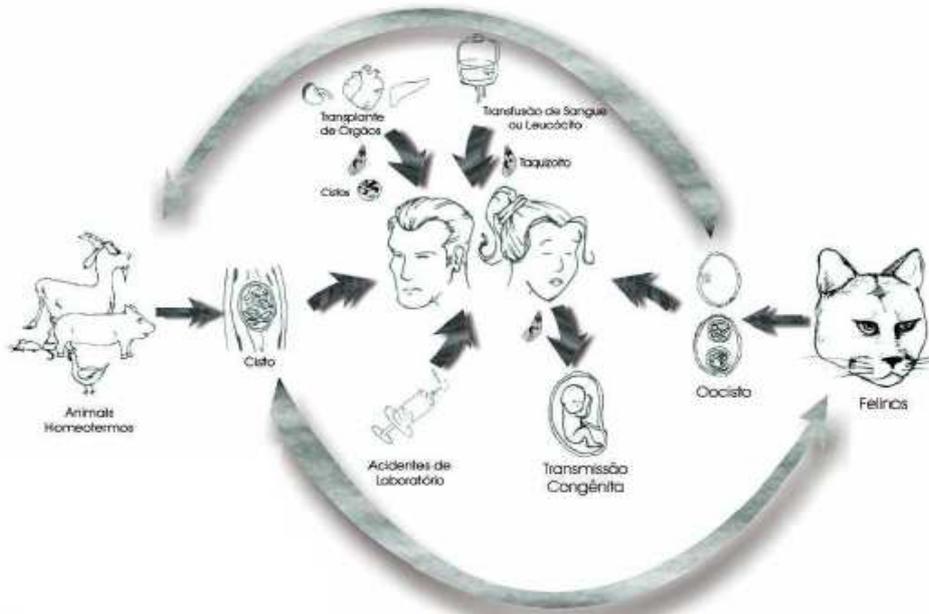
## 1.2. Ciclo biológico

*Toxoplasma gondii* apresenta um complexo ciclo de vida, descrito somente em 1970, quando se descobriu que os hospedeiros definitivos são membros da família Felidae, incluindo o gato doméstico (Frenkel et al., 1970). Vários animais de sangue quente servem como hospedeiros intermediários (Figura 2) (Dubey, 2004).

A fase sexuada do parasita ocorre no felídeo não imune que adquire a infecção pela ingestão de oocistos, cistos teciduais ou taquizoítos. O ciclo sexual ocorre nas células intestinais com formação e fertilização dos gametócitos e formação do zigoto. Este origina o oocisto imaturo que posteriormente é liberado após rompimento celular, sendo eliminado nas fezes após uma ou duas semanas de infecção. Os oocistos imaturos, não infectantes, sob condições ideais de temperatura, umidade e oxigênio, como as que ocorrem em regiões de clima tropical, esporulam e podem sobreviver de 12 a 18 meses no solo desde que mantidas tais condições (Rey, 2001; Montoya e Liesenfeld, 2004; Lappin, 2010).

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

latentes podem reativar transformando-se em taquizoítos provocando a reativação da doença (Suzuki, 2002; Kim e Weiss, 2008).



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

### 1.3. Epidemiologia da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose altamente disseminada, com taxas de prevalência variáveis em diversas regiões do mundo (Jones et al., 2007; Dubey et al., 2012). A incidência da doença está sujeita às variações próprias de cada região, como o tipo de clima, hábitos culturais e alimentares de determinadas populações, sendo que a soropositividade aumenta com a idade, mas não varia entre os sexos (Remington et al., 2005; Jones et al., 2007).

A infecção afeta ao redor de dois bilhões de pessoas no mundo (Petersen e Dubey, 2001; Montoya e Liesenfeld, 2004; Pereira-Chiocola et al., 2009). Na forma aguda, é assintomática em 80 a 90% dos indivíduos imunocompetentes apresentando evolução benigna. A linfadenopatia é a manifestação mais comum em 10 a 20% destes indivíduos podendo ser acompanhada de febre, astenia e mialgia (Montoya e Liesenfeld, 2004; Remington, 2004).

Nos Estados Unidos e no Reino Unido, estima-se que cerca de 16 a 40% da população esteja infectada. Na Espanha esta estimativa é de aproximadamente 60% e na França de 75-90% (Bahia-Oliveira et al., 2003; Hill et al., 2005). No Brasil, a prevalência sorológica de infecção por *T. gondii* é alta, variando em torno de 50 a 80% na população adulta (Bahia-Oliveira et al., 2003; Pappas et al., 2009).

Na grande São Paulo a prevalência gira em torno de 69% (Guimarães et al., 1993; Amendoeira et al., 1999). Kawarabayashi et al. (2007) verificaram uma positividade de 57,10% em um estudo que avaliou a prevalência de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em 1485 amostras de soros de mulheres atendidas na rede pública de saúde da grande São Paulo.

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

#### **1.4. Toxoplasmose humana**

*Toxoplasma gondii*, no hospedeiro humano, comporta-se como agente dotado de alta infectividade e de baixa patogenicidade. A fonte de infecção (cistos, oocistos ou taquizoítos), assim como o tamanho de inóculo, o estado imunológico do hospedeiro e, provavelmente a linhagem da cepa são fatores que influenciam na determinação do quadro mais ou menos severo da doença (Dubey et al., 2012).

### **1.4.1. Toxoplasmose em imunocompetentes**

Em imunocompetentes, formas assintomáticas da infecção constituem a maioria dos casos e figuram como acometimentos benignos, geralmente de cura espontânea (Mele et al., 2002). Contudo, cerca de 10-20% dos indivíduos infectados apresentam algum tipo de sintomatologia. A manifestação clínica mais típica consiste em linfadenopatia isolada, com linfonodos rígidos, não supurados e discretos. Febre, por vezes, pode ocorrer. Este quadro clínico assemelha-se muito ao da mononucleose infecciosa. A doença é geralmente auto-limitada, observando-se em poucas semanas o desaparecimento dos sintomas. Outras formas podem surgir, embora com menor frequência, como miocardites, pneumonites e encefalites. O aparecimento dos sintomas está provavelmente relacionado com a virulência da cepa e com o sistema imune do hospedeiro (Remington e Klein, 1995; Bushrod, 2004; Montoya e Liesenfeld, 2004).

### **1.4.2. Toxoplasmose ocular**

A toxoplasmose ocular pode ser de origem congênita ou adquirida, como resultado da infecção aguda ou reativação, e em ambas o acometimento ocular pode ser precoce ou tardio (Montoya e Liesenfeld, 2004). A infecção ocular acomete primariamente a retina e leva a um quadro de uveíte posterior (retinocoroidite) acompanhada frequentemente de uveíte anterior, sendo que no Brasil, tais sintomas são responsáveis por 70% dos casos (de Amorim Garcia et al., 2004).

O grave impacto social da toxoplasmose ocular deve-se ao fato de levar à perda acentuada da visão. A lesão mais freqüente é a retinocoroidite focal, granulomatosa, necrosante, de coloração branco-amarelada e de bordas mal definidas. Freqüentemente encontra-se lesão satélite à outras cicatrizes antigas hiperpigmentadas e atróficas, sendo este achado característico da toxoplasmose ocular. Os sintomas primordiais incluem diminuição da visão pelo edema, inflamação ou necrose retiniana e opacidades (nuvens) no campo visual, hiperemia conjuntival e ciliar, dor e fotofobia. As recidivas freqüentes decorrem, provavelmente, da ruptura do

cisto e liberação dos parasitas (Amato Neto et al.,1995; Remington et al.,1995). Em pacientes imunocompetentes é responsável por 30 a 50% dos casos (Villard et al., 2003; Copeland e Phillpotts, 2006).

### **1.4.3. Toxoplasmose congênita**

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

A gravidade da toxoplasmose congênita está relacionada com o período de infecção. A infecção adquirida durante o primeiro trimestre é mais severa do que aquela adquirida no segundo e terceiro trimestre (Remington et al., 1995). Um grande espectro de doenças clínicas pode ocorrer em crianças infectadas congenitamente, levando a um conjunto de manifestações, variando entre coriorretinite branda, que pode se apresentar muitos anos após o nascimento, a quadros mais severos com o aparecimento da tétrede de lesões: retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões e calcificação intracerebral. Destas, a doença ocular é a seqüela mais comum e a hidrocefalia a mais rara, porém, mais significativa (Carruthers, 2002; Kravetz e Federman, 2005; Petersen, 2007).

Em geral, a incidência da toxoplasmose congênita alcança índices de 400 a 4000 novos casos por ano (Lopez et al., 2000, Pinard et al., 2003). Tal incidência varia entre as regiões, mas é amplamente distribuída por todo o globo (Nóbrega e Karnikowski, 2005). Em países desenvolvidos, a doença afeta de 1 a 10 entre 10.000 recém-nascidos (Allain et al., 1998; Gilbert e Peckham, 2001).

No Brasil, a ocorrência de toxoplasmose congênita varia de 0,2 a 2% (Neto et al., 2000). Estudos indicam que o índice de soroprevalência de *T. gondii* em crianças e gestantes no Brasil é um dos maiores do mundo

(Tenter et al., 2000; Dubey, 2010). Estima-se que 50 a 80% das mulheres brasileiras em idade fértil exibem anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Por conseguinte, 20 a 50% delas são susceptíveis à infecção (Nóbrega e Karnikowski, 2005). Dados recentes indicam que a cada 1000 nascimentos, uma criança esteja infectada (Dubey et al., 2012).

#### **1.4.4. Toxoplasmose adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos**

##### **1.4.4.1. Toxoplasmose cerebral e Aids**

Devido ao caráter oportunista do parasita, outro grupo seriamente afetado pela doença é o de indivíduos submetidos ao uso de drogas imunossupressoras como os transplantados, pacientes com doenças linfoproliferativas e com deficiência na imunidade celular como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Luft et al., 1993; Liesenfeld et al., 1999; Ferreira, 2000). Ao contrário do curso favorável da toxoplasmose na maioria dos indivíduos imunocompetentes, a doença pode ser particularmente grave e muitas vezes fatal nestes grupos de pacientes (Liesenfeld et al., 1999).

O sistema nervoso central (SNC) é o local mais afetado pela infecção, no qual a encefalite é a mais importante manifestação da doença, causando severos danos ao paciente (Luft e Remington, 1992; Ferreira, 2000; Pereira-Chiocola et al., 2009; Dubey et al., 2012). A apresentação clínica da encefalite toxoplásmica classicamente apresenta-se como um processo sub-agudo, porém cerca de 10% dos casos pode se manifestar agudamente. Manifestações clínicas incluem mudanças no estado mental, apreensões, déficits motores focais, distúrbios de nervos cranianos, anomalias sensoriais, desordens de movimento e achados neuropsiquiátricos. Sinais meníngeos são raros. O achado focal mais típico é hemiparesia e alterações de fala (Franzen et al., 1997; Ferreira, 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004). Cerca de 95% da encefalite causada por *T.*

*gondii* deve-se à reativação da infecção latente pela perda progressiva da imunidade celular (Luft e Remington, 1992).

Os métodos de imagens podem revelar lesões focais no sistema nervoso, embora estas imagens possam compartilhar características semelhantes a abscessos, tumores, linfomas ou outras infecções oportunistas do sistema nervoso em pacientes HIV positivos (Franzen et al., 1997; Ferreira, 2000). Desta forma, o diagnóstico não pode ser baseado somente em observações clínicas e radiológicas (Montoya e Liesenfield, 2004; Pereira-Chiocola et al., 2009; Mentzer et al., 2012).

#### **1.4.4.2. Epidemiologia da toxoplasmose cerebral e Aids**

A toxoplasmose cerebral é a doença cerebral oportunista mais comum em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Oliveira et al., 2006; Vidal et al, 2008). Em alguns países, particularmente na África, casos da doença são somente excedidos por casos de meningoencefalite criptocócica (Pereira-Chiocola et al., 2009).

A introdução da terapia antiretroviral altamente eficiente (HAART) para o tratamento da infecção por HIV propiciou uma considerável redução tanto em morbidade quanto em mortalidade de tais pacientes (Potergies et al., 2004). Em países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento com acesso à HAART, observou-se uma diminuição de doenças oportunistas, incluindo infecções neurológicas (Sacktor, 2001; Abgrall et al., 2001; Jones et al., 2002). Entretanto, o impacto da HAART parece ser menor em países em desenvolvimento devido ao desconhecimento da infecção por HIV. Muitos pacientes apresentam como primeira doença a toxoplasmose cerebral e só após esta manifestação são diagnosticados como apresentando Aids. Como desconhecem que estão infectados pelo vírus HIV, não se beneficiaram do uso dos anti-retrovirais (Ammassari et al., 2000; Leport et al., 2001; Manfredi e Chiodo, 2001; Gray e Keohane, 2003; Antinori et al., 2004).

Em geral, *T. gondii* é a causa mais comum de lesão cerebral focal em pacientes HIV positivos (Luft e Chua, 2000; Gaspar et al., 2002; Manzardo et al., 2005). A prevalência da toxoplasmose cerebral nestes pacientes está associada à prevalência da infecção por *T. gondii* na população geral. Em Berlim e Paris, 25% dos pacientes com Aids apresentariam toxoplasmose cerebral ao passo que nos Estados Unidos esse valor seria de 10% (Harrison e McArthur, 1995; Dal Pan e McArthur, 1996).

A toxoplasmose figura na lista das principais doenças que causam considerável morbidade e mortalidade em pacientes com Aids pela alta prevalência de lesões expansivas intracranianas que causa nestes pacientes (Ammassari et al., 2000; Sacktor, 2002; Antinori et al., 2004). No Brasil, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, a queda da incidência foi inferior à observada em países desenvolvidos. Atualmente, ela representa a primeira causa de doença no sistema nervoso central (Bahia-Oliveira et al., 2003; Marins et al., 2003; Vidal et al., 2003, 2005; Ministério da Saúde, 2006; Oliveira et al., 2006; Pereira-Chiocola, 2009), sendo uma doença indicadora de infecção por HIV em 35% dos pacientes e definidora de Aids em 75% dos casos (Vidal et al., 2005).

### **1.5. Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose**

O isolamento do parasita de sangue ou outros fluídos corporais é um indicativo de uma possível infecção aguda (Montoya e Liesenfeld, 2004). Métodos tradicionais de detecção direta do parasita são dificilmente realizáveis, pois demandam certo tempo e apresentam baixa sensibilidade (Rey, 2001; Bastien, 2002). Por ser um parasita intracelular obrigatório, a cultura *in vitro* é complicada de ser mantida, tem custo elevado e necessita de longo tempo para fornecer resultado, muitas vezes só sendo efetiva em menos de 50% dos casos. O isolamento do parasita pode ser feito com a inoculação em camundongos, o que é mais sensível, porém requer de três a

seis semanas e manutenção de animais em biotérios (Lin et al., 2000; Kupferschmidt et al., 2001; Bastien, 2002).

Diante da dificuldade e da baixa sensibilidade dos exames que evidenciam os parasitas, os exames sorológicos são mais comumente utilizados no diagnóstico da toxoplasmose. Estes, se baseiam principalmente, na detecção de anticorpos específicos das classes IgM, IgA, IgE e IgG (Contreras et al., 2000). No momento, as técnicas mais utilizadas no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos os testes apresentam boa especificidade e sensibilidade nas fases aguda (pesquisa de anticorpos IgM) e crônica (pesquisa de anticorpos IgG) (Montoya e Lisenfeld, 2004; Shaapan et al., 2008).

A RIFI é rotineiramente utilizada entre os laboratórios. No entanto, na detecção de anticorpos IgM, há o inconveniente de possíveis resultados falsos-positivos, pela presença no soro de anticorpos IgM anti-IgG (fator reumatóide) ou falso-negativos, pela competição de anticorpos IgG com os IgM, pelos mesmos sítios antigênicos (Sanchez, 2001). O maior valor do teste para anticorpos específicos IgM reside no fato de que um teste negativo exclui o diagnóstico de toxoplasmose aguda com menos de três semanas de duração (Coutinho e Vergara, 2005). Em adição, a subjetividade na interpretação da fluorescência torna o método de difícil comparação entre laboratórios. Por esta razão, inúmeros dados na literatura mostram extrema variabilidade em uma mesma região (Shaapan et al., 2008; Macrì et al., 2009).

O teste ELISA, além de elevada sensibilidade e especificidade, tem como vantagem a rapidez, simplicidade técnica, versatilidade e objetividade de leitura. Detecta quantidades extremamente pequenas de anticorpos, podendo ter elevada precisão, se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados (Camargo, 2001; Sanchez, 2001). A demonstração de um aumento significativo no nível de anticorpos IgG e/ou a presença de anticorpos IgM poderia caracterizar o diagnóstico da toxoplasmose aguda. Entretanto, a elevada prevalência de anticorpos IgG

entre indivíduos normais 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; Kaye, 2011).

Com o intuito de determinar a fase da infecção principalmente em gestantes, a utilidade da detecção de anticorpos IgA e a avididade de anticorpos IgG também foram avaliadas (Bessières et al., 1992; Borges e Figueiredo, 2004). Anticorpos IgA apresentam cinética parecida aos dos anticorpos IgM, porém com sensibilidade maior (Lappalainen e Hedman, 2004). Constitui um importante marcador sorológico de infecção em gestantes, fetos e recém-nascidos, pois desapareceriam de circulação mais rapidamente que os anticorpos da classe IgM (Pinon et al., 2001; Borges e Figueiredo, 2004). A desvantagem é que aproximadamente 5% dos adultos não produzem IgA ou, alguns indivíduos podem permanecer com a IgA específica por anos. Por esta razão é pouco utilizado para compor o diagnóstico de infecção recente (Montoya e Liesenfeld, 2004).

O teste ELISA-avididade de IgG baseia-se na força total que ocorre entre a interação antígeno-anticorpo (Hedman et al., 1989; Joynson et al., 1990; Cozon et al., 1998). Os resultados são baseados na medida da avididade ou afinidade funcional dos anticorpos da classe IgG específicos para o *T. gondii*. Anticorpos de baixa avididade (30% ou menos) são produzidos em estágio precoce da infecção enquanto que anticorpos de alta avididade (60% ou mais) refletem infecção crônica. Valores entre 30% e 60% não permitem a caracterização da fase da doença, porém uma alta avididade de IgG exclui infecções primárias com menos de 4 meses de duração (Joynson et al., 1990; Gutiérrez e Maroto, 1996; Montoya e Liesenfeld, 2004). No entanto, uma baixa avididade de IgG muitas vezes não significa que a gestante tenha adquirido a infecção recentemente, pois resultados com baixa avididade podem persistir por até um ano. Assim, nestes casos, o teste de avididade não deve ser utilizado isoladamente como um teste de diagnóstico definitivo, sendo recomendado o seu uso em associação com outros testes laboratoriais, como a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de líquido amniótico e sangue, permitindo a identificação dos fetos infectados e

possibilitando que a terapia antiparasitária inicie precocemente, ainda na gestação (Jenum et al., 1998; Bou et al., 1999; Liensefeld et al., 2001; Remington et al., 2004).

Testes para detecção de anticorpos IgE devem ser somente usados em combinação com outros métodos sorológicos (Pinon et al., 1990; Wong et al., 1993). Sua demonstração não parece ser particularmente útil para diagnóstico de infecção por *T. gondii* no feto ou recém-nascido quando comparados com testes para anticorpos IgA (Montoya e Remington, 1995; Montoya e Liesenfeld, 2004). No entanto, alguns autores destacam que a detecção de anticorpos IgE correlaciona-se com a fase aguda ou reativada da toxoplasmose (Gross et al., 1997; Pinon et al., 1990) porém, pacientes IgE negativo não excluem a possibilidade de um estágio agudo ou reativado da infecção.

### **1.5.1. Diagnóstico da toxoplasmose cerebral**

O diagnóstico “definitivo” da toxoplasmose cerebral requer a demonstração direta do parasita no tecido cerebral. No entanto, na prática clínica, o diagnóstico é presuntivo dependendo da associação de achados sorológicos, clínicos e radiológicos (Mamidi et al., 2002; Pereira-Chiocola et al., 2009; Vidal et al., 2010).

Segundo Potergies et al. (2004), o diagnóstico presuntivo baseia-se em: i) sinais neurológicos focais, alterações do nível ou do conteúdo da consciência, evidência de imagem tomográfica de lesão expansiva, com ou sem realce da substância de contraste; ii) reações sorológicas positivas e iii) resposta favorável ao tratamento específico anti-*T. gondii*. A suspeita diagnóstica realizada por imagens seja por tomografia computadorizada (TC) e/ou ressonância nuclear magnética (RNM), revelam com eficácia as lesões focais no sistema nervoso, embora tais imagens também sejam vistas em abscessos, tumores, linfomas ou outras infecções oportunistas do sistema nervoso (Cohen, 1999; Ferreira, 2000; Bahia-Oliveira et al., 2003). Diante disso, deve ser acompanhada a evolução favorável tanto do ponto de vista

clínico como radiológico que ocorre, em geral, entre o 7º e 14º dia após a administração da terapia empiricamente instituída (Alonso et al., 2002; Potergies et al., 2004; Pereira-Chiocola et al., 2009). No entanto, em áreas com alta prevalência da toxoplasmose, tais pacientes podem ser expostos desnecessariamente aos efeitos adversos do tratamento específico, em até 40% dos casos (Raffi et al., 1997).

Métodos moleculares como a PCR se constitui numa importante ferramenta no diagnóstico da toxoplasmose cerebral. É um método rápido, sensível e específico, evitando a necessidade de procedimentos mais invasivos como a biópsia cerebral. Entretanto, na prática clínica, os resultados devem ser interpretados em associação com informações sorológicas, clínicas e radiológicas (Pereira-Chiocola et al., 2009; Vidal et al., 2010).

Em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), têm se notado uma extrema variação na sensibilidade da PCR (11.5-100%), porém com especificidade alta (96-100%) (Dupon et al., 1995; Cingolani et al., 1996; Cinque et al., 1996; Gianotti et al., 1997; Priya et al., 2002; Vidal et al., 2004). No entanto, a coleta de amostras de LCR pode ser invasiva e inapropriada em alguns pacientes com lesões cerebrais expansivas (Cingolani et al., 1998; Cohen, 1999; Pereira-Chiocola et al., 2009).

Como alternativa, a PCR em amostras de sangue tem sido empregada com sensibilidade variando entre 16-86% (Priya et al., 2002; Bastien, 2002; Bretagne, 2003; Colombo et al., 2005). Contudo, para a realização da técnica devem ser estabelecidos alguns critérios rígidos, como a escolha dos primers, o processamento das amostras, a reação em si 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). Em adição, mesmo a PCR sendo um método relativamente simples e rápido, só pode ser realizada em laboratórios com razoável infraestrutura, sendo ainda indisponível em grande parte dos centros hospitalares de países em desenvolvimento (Joseph et al., 2002).

O valor dos testes imunológicos na toxoplasmose cerebral também tem sido avaliado. A detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* é discutível, uma vez que a doença resulta, comumente, de reativação da infecção latente, durante fase avançada de imunossupressão, sendo o perfil sorológico destes pacientes, em geral com ausência de anticorpos IgM, semelhante ao da população com infecção crônica (Danneman et al., 1992; Raffi et al., 1997). Em concordância, a pesquisa de imunoglobulinas IgA no soro, um possível marcador de infecção aguda, parece não ser útil para o diagnóstico diferencial da encefalite toxoplásmica. Alguns estudos destacam que não houve correlação entre a positividade de anticorpos IgA no soro e o diagnóstico de toxoplasmose cerebral (Darcy et al., 1991; Hajeer et al., 1994; Borges e Figueiredo, 2004b).

Em adição, alguns artigos sugerem que altos títulos de anticorpos IgG no soro apresentam elevado valor diagnóstico para toxoplasmose cerebral (Derouin et al., 1996; Hellerbrand et al. 1996; Vidal e Penalva de Oliveira, 2002; Colombo et al., 2005, Vidal et al., 2005; Meira et al., 2008; Vidal et al., 2010). Tais anticorpos teriam alta avidéz, suportando a idéia de que a reativação da infecção latente ocorre na resposta imune secundária (Mechain et al., 2000; Colombo et al., 2005). Entretanto, estes anticorpos podem não ser detectados em aproximadamente 5% dos pacientes devido à imunossupressão (Skiest, 2002; Vidal et al., 2005; Meira et al., 2008; Pereira-Chiocola et al., 2009).

Têm-se demonstrado que aproximadamente 50% dos pacientes com encefalite por *T. gondii* irão apresentar anticorpos específicos no LCR (Wainstein et al., 1993). Collazos (2003) ao analisar o valor do diagnóstico imunológico no LCR verificou uma variação na sensibilidade e especificidade por volta de 60 a 70%. Estes achados, porém, devem ser interpretados com cautela, pois a presença de tais anticorpos pode significar apenas transferência passiva de anticorpos séricos para o SNC (Patel et al., 1993; Borges e Figueiredo, 2004b). Outro fator que deve ser considerado é que a encefalite por *T. gondii* é primariamente uma infecção parênquimal, onde a capacidade de se detectar um aumento da produção intratecal de

anticorpos dependerá da proximidade da lesão às meninges (Potasman et al., 1988; Borges e Figueiredo, 2004a).

Apesar dos diferentes estudos, a utilização do diagnóstico imunológico parece ser um recurso a ser considerado na abordagem inicial dos pacientes com suspeita ou risco de toxoplasmose cerebral.

### **1.6. Antígenos de superfície de *T. gondii***

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

A superfície celular externa dos taquizoítos é recoberta com proteínas de peso molecular variando de 22 a 43 kDa. Todas ancoradas na membrana por pontes de glicosilfosfatidilinositol (GPIs) (Tomavo et al., 1993). Essas proteínas são estruturalmente relacionadas ao antígeno de superfície altamente imunogênico SAG1 (p30), que representa até 5 % do total de proteínas de taquizoítos, porém não expresso em bradizoítos ou esporozoítos (Lekutis et al., 2000). Coletivamente estes antígenos são conhecidos como superfamília de proteínas SRS (seqüências relacionadas à SAG1) (Jung et. al., 2004). Este grupo de antígenos promove a interação entre a membrana do parasita e a célula hospedeira através de moléculas ligantes ou receptores celulares que auxiliam o parasita na entrada da célula (Kasper e Mineo, 1994; Grimwood e Smith, 1995).

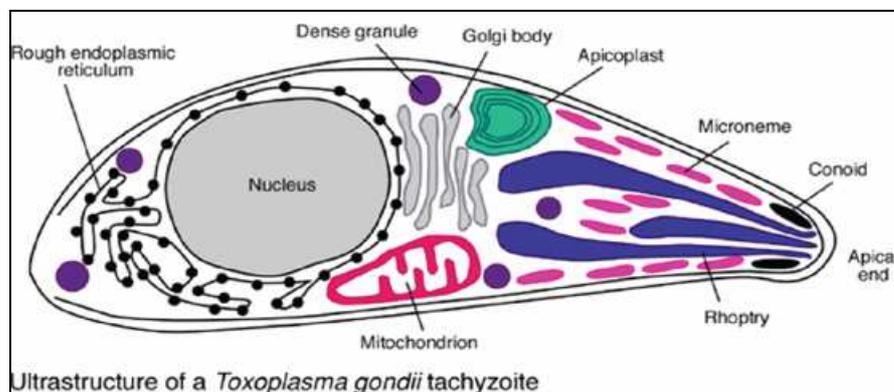
A expressão dessas proteínas é regulada de acordo com a fase do desenvolvimento biológico do parasita. As proteínas SAG1 e SAG3 (p43) são exclusivamente produzidas por taquizoítos, bem como a SAG2A (Gross et al., 1996; Lekutis et al., 2000; Cleary et al., 2002). Já a SAG2C/D, BSR4 e SRS9 são encontradas apenas em bradizoítos (Lekutis et al., 2000; Cleary et al., 2002). As proteínas SAG4 e BSR4/p36 são proteínas de superfície ligadas à proteína do citosol BAG1, expressa especificamente em bradizoítos (Bohne et al., 1995; Odberg-Ferragut, 1996). Em contrapartida,

todos os membros da família SAG5 são transcritos em taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* (Spano et al., 2002).

### 1.7. Invasão celular e organelas secretórias

A invasão celular é um evento chave na biologia dos parasitas do filo Apicomplexa. Durante este processo ocorre a participação de duas principais classes de proteínas: as de superfície que agem como ligantes no reconhecimento inicial da célula alvo e as excretadas/secretadas que estão estocadas em organelas secretórias e que medeiam a invasão ativa dos taquizoítos (Spano et al., 2002; Borges, 2005; Carruthers e Tomley, 2008).

O complexo apical é constituído pelas organelas secretórias denominadas micronemas, roptrias e grânulos densos; e pelos elementos do citoesqueleto (Figura 3). Dentre esses elementos destaca-se o conóide, que se localiza no extremo apical do parasita e associa-se aos microtúbulos e ao citoesqueleto de actinmiosina promovendo a força necessária para a movimentação do parasita.



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

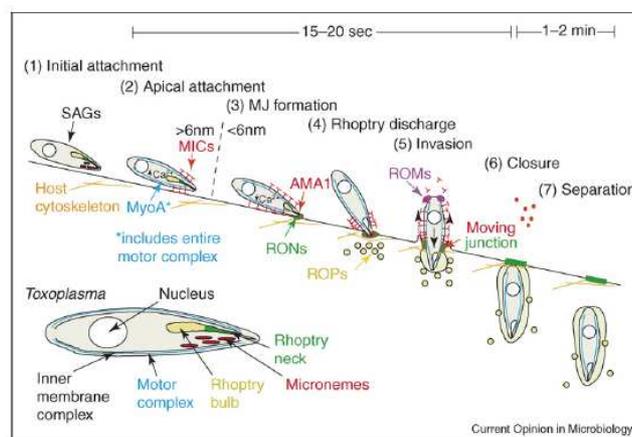
Fonte: Ajioka et al., 2001.

A invasão por *T. gondii* é rápida (<30 s) e dinâmica, constituindo um processo complexo que ocorre em etapas (Figura 4) (Carruthers e Sibley, 1997; Wan et al., 1997; Carruthers e Tomley, 2008). Pela ausência

de qualquer organela locomotora, os apicomplexos exibem um modo único de deslocamento substrato-dependente, denominado *gliding motility* (Sibley, 2004; Soldati e Meissner, 2004).

Desta forma, o taquizoíta por meio do conóide estabelece contato de seu extremo apical com a membrana da célula hospedeira e realiza o movimento de *gliding*, que consiste na rotação do parasita ao longo de seu eixo, oscilação e ondulação (Speer et al., 1997, Hakansson et al., 1999). Esse processo, que envolve o sistema actinmiosina permite a liberação apical e subsequente redistribuição de adesinas provenientes dos micronemas em direção ao pólo posterior do parasita. A interação com ligantes na superfície da célula hospedeira leva à formação de uma junção móvel permitindo o processo de invasão da célula (Meissner et al., 2002; Roiko e Carruthers, 2009). Os componentes das roptrias são secretados simultaneamente para formação do vacúolo parasitóforo contribuindo tanto em sua formação como nas propriedades funcionais de sua membrana (Wan et al., 1997).

O sucesso de *T. gondii* como patógeno depende de sua capacidade de invadir, residir e multiplicar-se dentro da célula hospedeira. No interior das células, a formação dos vacúolos o protege contra radicais livres, variações de pH, flutuações osmóticas e contato com anticorpos, evitando assim, os mecanismos de defesa do hospedeiro (Hill et al., 2005; Blader e Saeij, 2009).



**Figura 4.** Modelo integrado de invasão por *T. gondii*.

Fonte: Carruthers VB e Boothroyd JC, 2007.

Em continuidade, *T. gondii* excreta/secretora uma grande variedade de proteínas. Várias já foram descritas e exercem importantes funções na invasão, replicação e manutenção dos parasitas na célula hospedeira (Cesbron-Delauw e Capron, 1993; Carruthers, 2005; Carruthers e Boothroyd, 2007; Roiko e Carruthers, 2009). A estas proteínas ou antígenos denominam-se de excreção/secretão ou ESA (*excreted/secreted antigen*), detalhados a seguir de acordo com sua organela secretória. Tais proteínas são apresentadas na literatura, em sua maioria, pela abreviação das três primeiras letras da organela de origem. Sua expressão e conseqüente estimulação do sistema imune hospedeiro constituem em um importante objeto de estudo na toxoplasmose (Cesbron-Delauw e Capron, 1993; Prigionne et al., 2000; Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008; Pereira-Chiocola et al., 2009).

### **1.7.1. Micronemas**

Os micronemas são estruturas cilíndricas localizadas no terço anterior do corpo do parasita (Carruthers e Boothroyd, 2007; Carruthers e Tomley, 2008). Promovem motilidade, ligação e interação parasita-hospedeiro pela produção de antígenos de excreção/secretão. A produção destes antígenos é regulada por estas interações parasita-hospedeiro e por níveis de cálcio intracelular do parasita (Carruthers e Sibley, 1999; Brecht et al., 2001; Reiss et al., 2001; Carruthers e Boothroyd, 2007).

As proteínas dos micronemas (MIC) pertencem à família TRAP (proteína anônima relacionada à trombospondina) que se caracteriza por exibir um domínio transmembrana que age como uma âncora molecular para o movimento de *gliding* do parasita. Esse domínio corresponde ao tipo EGF (fator de crescimento epidermal) e confere a essas proteínas funções adesivas e de interações receptor-ligante (Kappe et al., 1999; Carruthers e Boothroyd, 2007). São conhecidas pela sigla TgMIC e possuem a capacidade de se agregarem a complexos proteicos para atuação mútua. De acordo com as características estruturais, as proteínas solúveis

compreendem as TgMIC1, 3, 4 e 11; e as transmembranas TgMIC2, 6, 7, 8, 9 e TgAMA1.

As TgMIC2 (Donahue et al., 2000), TgAMA1 (Hehl et al., 2000), TgMIC6, 7, 8 e 9 (Meissner et al., 2002) formam complexos moleculares com uma ou mais adesinas solúveis do micronema, de modo que as primeiras servem como carreadoras das segundas, facilitando o tráfico de proteínas recém-sintetizadas para essas organelas. As adesinas solúveis apresentam um papel importante durante os estágios de invasão da célula hospedeira. Pela ancoragem da TgMIC1 e TgMIC4 na superfície do parasita, TgMIC6 pode estabelecer uma ponte entre o parasita e a célula hospedeira e em seguida se redistribuir em direção ao pólo posterior do mesmo, contribuindo assim, na motilidade e processo de invasão. Esses dados sugerem que a TgMIC6 funciona como molécula de ancoragem nesse tráfico para os micronemas (Reiss et al., 2001; Joiner e Roos, 2002).

Outras proteínas micronemiais (TgMIC5, TgMIC10, TgM2AP e TgSUB1) não contêm seqüências adesivas, mas somente funções acessórias ou alternativas (Brydges et al., 2000; Donahue et al., 2000; Hoff et al., 2001; Miller et al., 2001; Rabenau et al., 2001).

### **1.7.2. Roptrias**

As roptrias são organelas secretórias eletrodensas, delimitadas por membranas, que assumem a forma de largas claves (Perkins, 1992). Suas proteínas participam do processo de invasão das células hospedeiras, assim como do processo de biogênese de um vacúolo parasitóforo funcional ao parasita (Brecht et al., 2001; Nakaar et al., 2003; Carruters e Boothroyd, 2007; Blader e Saeij, 2009).

As proteínas das roptrias são representadas pela abreviação ROP, com o tamanho variando de 42-68 kDa (Beckers et al., 1996; Park e Nam, 1999). No entanto, algumas proteínas derivam do “pescoço” desta organela, por este motivo são chamadas de RON (Alexander et al., 2005; Bradley et al., 2005). A ROP1 (60 kDa) se constitui num importante fator de

aumento de penetração (Ossorio et al., 1992) ao passo que ROP2, 3, 4 e 8 são antigenicamente reativas entre si e podem se sobrepor em funções (Carruthers, 1999).

As secreções de proteínas das roptrias e dos micronemas se associam à superfície do parasita para formar o movimento de junção (MJ). Tal movimento é formado pela ação das RON2, RON4, RON5 e RON8 juntamente com a TgAMA1 dos micronemas, e se torna visível quando a membrana do parasita entra em contato com a célula hospedeira onde os parasitas deslizam pelo sistema actina-miosina (Alexander et al., 2005; Straub et al., 2009; Blader e Saeij, 2009). Desta forma, promovem a formação do vacúolo parasitóforo pela invaginação e encapsulação do parasita no citosol do hospedeiro (Martin et al., 2004; Sinai, 2008).

### **1.7.3. Grânulos densos**

Os grânulos densos são organelas esféricas distribuídas pelo citoplasma do parasita com uma média de diâmetro de  $0.2\mu\text{m}$  (Carruthers, 1999; Prigione et al., 2000). A secreção de proteínas dessas organelas ocorre após a invasão do parasita e sua internalização dentro do vacúolo parasitóforo, principalmente nos primeiros 10-20 minutos da formação do vacúolo (Carruthers e Sibley, 1997; Nam, 2009). Tais proteínas associam-se com a membrana do vacúolo parasitóforo e com a rede membranosa vacuolar derivada do parasita e são relacionadas à sobrevivência intracelular e replicação (Carey et al., 2000; Neudeck et al., 2002; Souza, 2006).

Foram descritas até o momento 16 proteínas dos grânulos densos (GRA1-GRA10), GRA12, GRA14, 2 isoformas de nucleotídeo trifosfato hidrolase (NTPase I e II) (Johnson et al., 2003) e dois inibidores de protease (TgP1 e 2) (Morris et al., 2002; Pszeny et al., 2002). Estas proteínas ditam a conformação da rede de membranas tubular intravacuolar caracterizando a estrutura característica de roseta destes parasitas (Mercier et al., 2002; Magno et al., 2005).

## 1.8. Resposta imunológica na toxoplasmose

A resposta imune de um hospedeiro à toxoplasmose é complexa e envolve tanto mecanismo celular quanto humoral, sendo o primeiro um fator preponderante de resistência contra a infecção (Kahi et al., 1998; Blader e Saeij, 2009; Munoz et al., 2011). A resposta imune é formada por uma cascata de eventos, envolvendo a imunidade inata que, embora inespecífica, possui componentes importantes para a ativação, a diferenciação celular e a consolidação da defesa específica (Kahi et al., 1998; Abbas et al., 2011).

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

Células T CD4<sup>+</sup> são essenciais em ambas as respostas Th1 e Th2, as quais medeiam tanto a resposta imune celular, quanto a humoral respectivamente. Estes dois tipos funcionais de células T helper diferem de acordo com as citocinas que sintetizam. Células Th1 produzem IL-2, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou - $\beta$  (TNF- $\beta$ ). As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Sarciron e Gherardi, 2000). Na toxoplasmose, a citocina chave para a resistência é a IFN- $\gamma$  envolvendo as atividades das células T helper e T citotóxicas, caracterizando resposta tipo Th1. Infecções experimentais em camundongos revelam que a produção de IFN- $\gamma$  é um passo crítico para a proteção do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii* (Yap e Sher, 1999; Fujigaki et al., 2002). Linfócitos T e células Natural Killer (NK) produzem IFN- $\gamma$  para que ocorra a ativação de macrófagos e das próprias células NK (Filisetti e

Candolfi, 2004). Este mecanismo participa na indução da conversão de taquizoítos em bradizoítos (Bohne et al., 1993).

As células dendríticas controlam a magnitude e a qualidade da resposta Th1 com a produção de interleucina-12 (IL-12) (Scott e Hunter, 2002). Tanto parasitas íntegros quanto antígenos solúveis são capazes de induzir a produção de IL-12 e, desta forma estimular células efetoras como linfócitos T e células NK a produzir IFN- $\gamma$  (Buzoni-Gatel et al., 2006). Da mesma maneira que as células dendríticas e as células NK, os macrófagos também contribuem na modulação da imunidade pela secreção de IL-12 e se destacam por exercer funções efetoras antimicrobianas. A produção de reagentes oxidativos, óxido nítrico e atividade de enzimas lisossomais constituem alguns dos vários mecanismos microbicidas dos macrófagos (Stafford et al., 2002).

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

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

presença de complemento, anticorpos específicos podem lisar taquizoítos extracelulares (Schreiber e Feldman, 1980).

### **1.8.1. Resposta imunológica na toxoplasmose cerebral**

Em pacientes com Aids, o contexto de resposta imune é diferente devido à infecção por HIV, uma vez que este é um processo complexo de equilíbrio e desequilíbrio que compreende, por um lado, a replicação viral e, por outro, a tentativa de reconhecimento e eliminação das células infectadas pelo sistema imune. O curso da Aids é progressivo, iniciam-se pelo conjunto de sinais e sintomas observados durante a infecção aguda, seguido de uma fase assintomática, até o aparecimento de infecções oportunistas e/ou neoplasias, que ocorre secundariamente à grande destruição de populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Uma vez que os linfócitos B e os linfócitos T CD8<sup>+</sup> requerem a ativação pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a redução no número e as alterações funcionais observadas nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> resultam no colapso tanto da imunidade humoral quanto da imunidade celular (Abbas et al., 2011b). Com o passar dos anos, a produção desses linfócitos não é suficiente para contrabalançar a ação do HIV e observa-se a queda rápida e progressiva do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico. Quando o número total desses linfócitos se torna inferior a 400 células/ $\mu$ l, a habilidade de o sistema imune responder adequadamente diminui. Infecções oportunistas por patógenos que normalmente não são patogênicos em indivíduos imunocompetentes ocorrem, como é o caso do *T. gondii*.

A reativação preferencial da infecção crônica pelo *T. gondii* no SNC já foi demonstrada por vários autores (revisto por Ferreira e Borges, 2002). De maneira geral, diversos estudos atribuem a dois fenômenos como responsáveis pela reativação da toxoplasmose em pacientes com Aids. De um lado, uma diminuição de células T CD4<sup>+</sup> e da resposta imune celular, e de outro, um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 (Bessièrre et al., 1997; Deckert-Schluter et al., 1997; Levy et al., 1998). Em consequência, a baixa imunidade local, déficit dos mecanismos que inibem a multiplicação do

parasita, como anticorpos específicos e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), e maior facilidade de o parasita penetrar no cérebro do que em outros órgãos agrava ainda mais a situação destes pacientes (Ambroise-Thomas e Pelloux, 1993; Montoya e Remington, 1997). Os preditores de risco de encefalite por *T. gondii* incluem status sorológico, grau de imunossupressão e quimioprofilaxia (Grant et al., 1990). Em pacientes com Aids, mais de 95% das encefalites toxoplásmicas são relacionadas à reativação de foco primário, e mais de 90% destes pacientes têm o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> abaixo de 200 células/ $\mu$ l (Luft e Remington, 1988; Porter e Sande, 1992).

Como resposta primária a infecção por *T. gondii*, macrófagos, granulócitos e células dendríticas secretam citocinas próinflamatórias, tais como IL-12, a mais importante indutora da síntese de IFN- $\gamma$  (Gazzinelli et al., 1994). Esta produção de IFN- $\gamma$  por sua vez é essencial para a resistência contra a infecção com o parasita (Suzuki et al., 1997). Células apresentadoras de antígenos ativadas juntamente com IFN- $\gamma$  auxiliam na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que são subsequentemente recrutadas para o cérebro (Filisetti e Candolfi, 2004). Células T CD8<sup>+</sup> são essenciais na resistência devido sua ação citotóxica a qual promove a lise de células infectadas pelo parasita durante a fase ativa da infecção (Subauste et al., 1991). Células T CD4<sup>+</sup> e astrócitos também contribuem para a resistência e ativam células T CD8<sup>+</sup> pela secreção de algumas citocinas (Munoz et al., 2011; Denkers e Gazzinelli, 1998). Durante a toxoplasmose cerebral, monócitos, células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> migram para o SNC e ativam células residentes da micróglia (Schlüter et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992; Suzuki, 2002). Todavia, a ativação de células gliais pode ser observada antes da invasão do parasita no SNC devido a níveis sistêmicos de citocinas próinflamatórias durante a infecção aguda (Feustel et al., 2012).

Assim, o cérebro já com inflamação parece induzir estruturas especializadas que guiam a migração de células T neste sítio imuno-privilegiado. Astrócitos e células da micróglia se tornam ativados por IFN- $\gamma$  e são as maiores células efetoras no controle da replicação do parasita

(Suzuki, 2002). Após infecção, astrócitos e micróglia secretam IL-1, IL-6, GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) ou IL-10 e TNF, respectivamente (Fischer et al., 1997). A produção de IL-10 em cérebros infectados por *T. gondii* favorece a sobrevivência do parasita e a persistência da infecção (Aliberti et al., 2005; Wilson et al., 2005).

Enquanto células dendríticas não podem ser detectadas no parênquima cerebral de indivíduos saudáveis, cérebros de camundongos cronicamente infectados mostram 50 a 100 vezes de expansão destas células após a infecção cerebral (Feustel et al., 2012). Baseada na sua forte expressão de moléculas coestimulatórias e a capacidade de processar e apresentar antígenos à células T, células dendríticas cerebrais *in vitro* são supostamente importantes indutoras de respostas de células T na toxoplasmose cerebral (John et al., 2011). Como as células dendríticas também mostram um alto nível de produção de IL-12 elas podem ser importantes para a manutenção da produção de IFN- $\gamma$  por células T no cérebro (Fischer et al., 2000). Estudos *in vitro* sugerem que astrócitos e células da micróglia são capazes de inibir a replicação do parasita após ativação (Chao et al., 1993; Peterson et al., 1995; Halonen et al., 1996), possivelmente explicando porque os neurônios são o tipo celular predominantemente infectado (Wilson e Hunter, 2004).

A presença de IFN- $\gamma$  é de extrema importância no controle da toxoplasmose cerebral, pois medeia uma variedade de mecanismos imunes anti-*Toxoplasma* do hospedeiro (Sarciron e Gherardi, 2000; Feustel et al., 2012). Entretanto, algumas citocinas estimulam ou diminuem os níveis de IFN- $\gamma$ , que, em particular, no caso de pacientes com Aids, os quais a resposta imune é alterada, se faz de extrema importância o estudo deste mecanismo. Desta forma, a reativação da infecção é, também, devida à redução na expressão de IFN- $\gamma$ , o qual resulta na falta de ativação de macrófagos e células microgliais (Gazzinelli et al., 1993). Macrófagos ativados, células NK e a produção de diferentes citocinas, tais como IL-12 e IFN- $\gamma$  são cruciais na resposta imune contra *T. gondii* em ambas as fases aguda e crônica da doença (Gazzinelli et al., 1992; 1994).

Com relação à resposta imune humoral, pacientes com TC/Aids desenvolvem altos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (Colombo et al., 2005, Vidal et al., 2005; Meira et al., 2008; Vidal et al., 2010). Sabe-se que IgG é a principal imunoglobulina do sangue, respondendo por cerca de 70 a 75% do total de imunoglobulinas. Em geral, existe concordância nas porcentagens de cada subclasse de IgG no soro humano, apesar do uso de diferentes reagentes e métodos de ensaio. As proporções de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 séricas são, respectivamente, 60-71%, 19-32%, 5-8% e 0.7-4% (Watthanakulpanich et al., 2008). Estas subclasses apresentam diferentes propriedades biológicas e físico-químicas e por isso podem ser produzidas preferencialmente em resposta a diferentes antígenos e condições patológicas. Exibem diferentes perfis de funções efetoras, principalmente em relação a sua capacidade em mediar a ativação do complemento e ligação com receptores Fc na superfície de células envolvidas na resposta imune (Souza et al., 2005; Watthanakulpanich et al., 2008). As diferenças nas propriedades biológicas das quatro subclasses de IgG estimularam diversos pesquisadores a estudar a resposta dessas subclasses em uma variedade de agentes infecciosos. Esta resposta parece variar consideravelmente, dependendo da natureza do antígeno em questão (Fatoohi et al., 2004; Correa et al., 2007; Béla et al., 2008). Por exemplo, IgG2, responde preferencialmente a antígenos formados de carboidratos como os polissacarídeos bacterianos; IgG1, à antígenos protéicos, principalmente virais. Na resposta a filariose humana predomina a resposta da subclasse IgG4 (Kurniawan et al., 1993; Mohanty et al., 2001).

Neste contexto, um conhecimento mais aprofundado a cerca da imunidade humoral na toxoplasmose cerebral se faz necessário, uma vez que o status sorológico do paciente deve fazer parte dos exames iniciais de todos os imunocomprometidos. A presença de sorologia positiva para *T. gondii* em pacientes com níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> abaixo de 200 células/ $\mu$ l e que não fazem quimioprofilaxia têm risco de, aproximadamente, 35% de desenvolver toxoplasmose no SNC em dois anos. Os soronegativos devem

ser orientados quanto às medidas preventivas para evitar a infecção (Clough et al., 1997).

Diante do exposto acima, a toxoplasmose constitui um sério problema de saúde pública. Portanto, estudar e melhorar as condições diagnósticas através da análise da resposta imune celular e humoral em pacientes imunossuprimidos é de extrema importância, uma vez que, mudanças na resposta imune podem contribuir na progressão da doença. Em adição, o estudo de metodologias imunológicas aplicadas a diferentes materiais biológicos e de estratégias para a produção de antígenos compõem ferramentas importantes para o diagnóstico laboratorial desta infecção.

Como em outras doenças infecciosas e parasitárias, o monitoramento da resposta imune a antígenos envolvidos nos diferentes estágios da infecção pode fornecer informações valiosas que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de controle do sistema imune sobre os parasitas. Estes conhecimentos podem cooperar, também com novas condutas de tratamento, além de um melhor entendimento da patogênese da doença.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Estudar a resposta imune celular e humoral na co-infecção toxoplasmose cerebral/Aids utilizando como antígeno as proteínas excretadas/secretadas por taquizoítos de *T. gondii*, produzidas a partir de taquizoítos mantidos em culturas de células livres de soro fetal bovino.

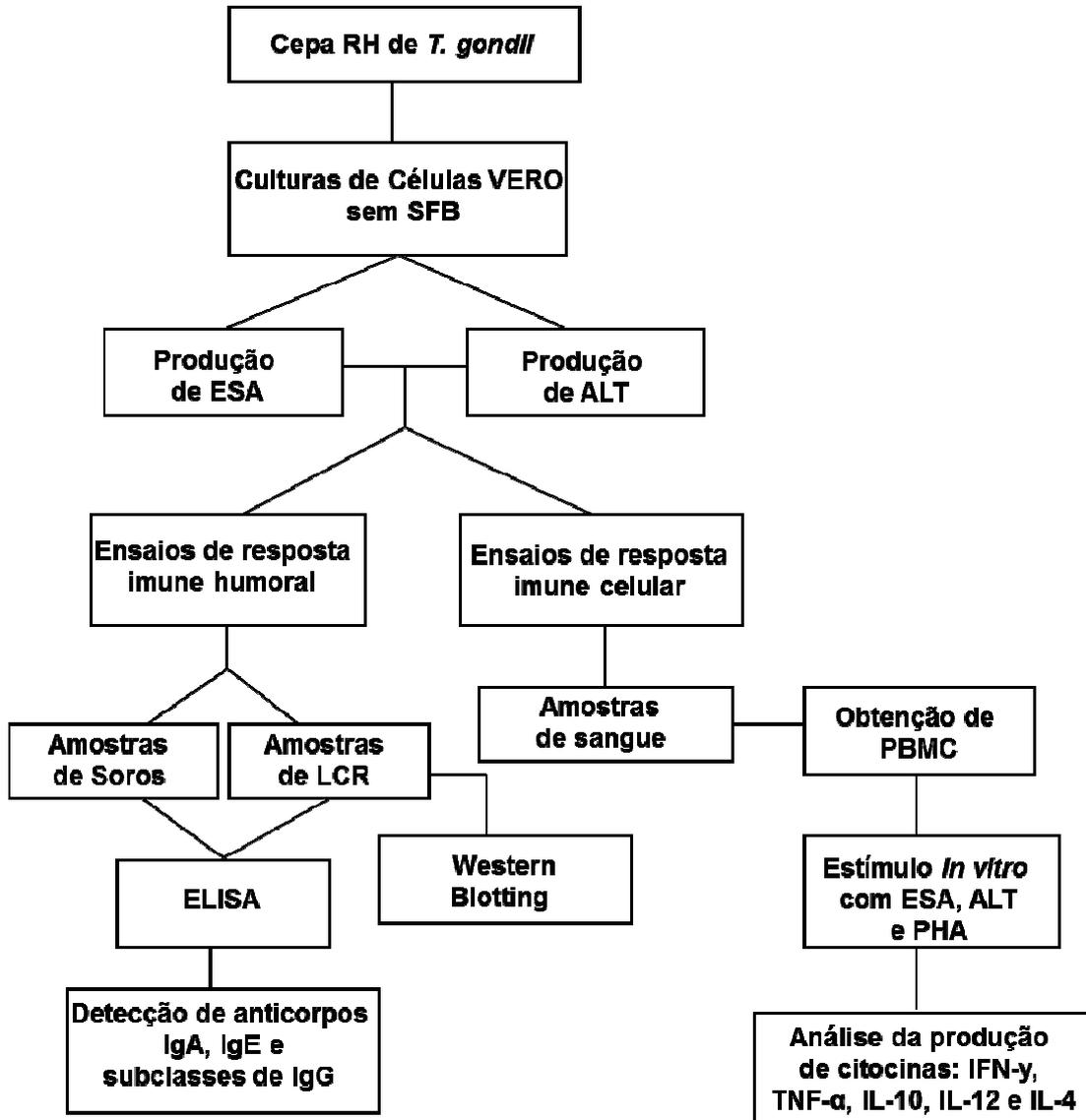
### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar na co-infecção toxoplasmose cerebral/Aids:

- 1- Níveis de anticorpos IgG no LCR e se são preditores da infecção toxoplásmica;
- 2- Níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em amostras de soro e LCR envolvidas na infecção;
- 3- Níveis de IgA e IgE em amostras de soro;
- 4- Produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL12 (p70), IL-4, TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) durante a infecção.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento Experimental



## **3.2. Pacientes**

### **3.2.1. Para experimentos de resposta imune humoral**

#### **3.2.1.1. Amostras de soros**

Analizamos 265 amostras de soros divididos em 5 grupos:

*Grupo I:* 58 pacientes TC/Aids, com diagnóstico sorológico positivo para HIV.

*Grupo II:* 49 pacientes com Aids/outras neuroinfecções (diagnosticados clinicamente) e positivos para toxoplasmose.

*Grupo III:* 58 pacientes com Aids/outras neuroinfecções (diagnosticados clinicamente) e negativos para toxoplasmose.

*Grupo IV:* 50 indivíduos soropositivos para toxoplasmose (IgM negativo, IgG positivo, avidéz alta e HIV negativo).

*Grupo V:* 50 soros de indivíduos sadios (soronegativos para HIV e *T. gondii*).

#### **3.2.1.2. Amostras de LCR**

Analizamos 270 amostras de LCR de pacientes com Aids divididos em 3 grupos conforme a presença ou não de toxoplasmose ativa:

*Grupo I* – 99 pacientes com TC/Aids, com diagnóstico sorológico positivo para HIV.

*Grupo II* – 112 pacientes com outras neuroinfecções (diagnosticados clinicamente) e soropositivos para toxoplasmose.

*Grupo III* – 59 pacientes com outras neuroinfecções (diagnosticados clinicamente) e sorologia negativa para toxoplasmose.

### **3.2.2. Para experimentos de resposta imune celular**

#### **3.2.2.1. Amostras de sangue**

Analizamos 70 amostras de sangue divididas em 4 grupos:

*Grupo I:* 45 amostras, sendo 3 amostras por cada paciente com TC/Aids, com diagnóstico sorológico positivo para HIV. A primeira amostra foi coletada antes do tratamento, a segunda 7 dias e a terceira 15 dias após o tratamento específico para *T. gondii*.

*Grupo II:* 5 amostras de pacientes infectados pelo HIV com toxoplasmose cerebral prévia e tratamento antiparasitário adequado.

*Grupo III:* 10 amostras de indivíduos soropositivos para toxoplasmose (IgM negativo, IgG positivo e avidéz alta e HIV negativo).

*Grupo IV:* 10 amostras de indivíduos sadios (soronegativos para HIV e *T. gondii*).

### **3.2.3. Critérios diagnósticos da toxoplasmose cerebral**

Todos os pacientes eram maiores de 18 anos e provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, SP, encaminhados ao Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz para a realização do diagnóstico molecular e/ou sorológico da toxoplasmose.

O diagnóstico da toxoplasmose cerebral foi adaptado de acordo com as “definições de diagnóstico clínico-radiológico de toxoplasmose cerebral em pacientes com Aids” (CDC, 1993; Potergies et al., 2004). Os critérios diagnósticos utilizados foram: 1) pacientes com presença de sinais neurológicos focais, alterações do nível ou do conteúdo da consciência, evidência de imagem tomográfica de lesão expansiva, com ou sem realce após a administração da substância de contraste, via de regra, estes pacientes apresentam níveis de células T CD4<sup>+</sup> abaixo de 200 células/ $\mu$ l sangue; 2) presença de reações sorológicas (ELISA e RIFI) e/ou PCR positivos usando os iniciadores B22 e B23 do gene B1 de *T. gondii* (Colombo et al., 2005) e 3) resposta clínica e radiológica ao tratamento específico anti-*T.gondii*.

Os pacientes do Grupo II com toxoplasmose cerebral prévia (item 3.2.2.1.) apresentaram antecedente de episódio único de toxoplasmose cerebral e tratamento antiparasitário adequado. Todos os casos evoluíram

com controle clínico e radiológico e receberam HAART. A média (variação) do tempo transcorrido entre a apresentação da toxoplasmose cerebral e a coleta das amostras para o estudo atual foi de 6.6 (1-15) anos. Todos os pacientes tinham níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> acima de 200 células/mm<sup>3</sup> de sangue e carga viral-HIV < 50 cópias/mL. Em todos os casos, a profilaxia secundária já tinha sido descontinuada.

Os pacientes dos grupos II e III (pertencentes aos itens 3.2.1.1. e 3.2.1.2) tinham como outras neuroinfecções: encefalite por citomegalovírus, meningoencefalite criptocócica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, desordem motora cognitiva associada ao HIV, tuberculose cerebral, epilepsia e doença cerebrovascular. Todas as amostras foram então testadas por ELISA.

#### **3.2.4. Obtenção das amostras**

##### **3.2.4.1. Amostras de soros e LCR**

Foram coletados 5 mL de sangue em tubo contendo EDTA e aproximadamente 3 mL de LCR de cada paciente. As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 min a 1800 g para a obtenção de soro. Após a realização do diagnóstico imunológico, as amostras foram acondicionadas a -20°C até o momento do uso.

Todas as amostras dos pacientes do Grupo I foram coletadas antes ou até o terceiro dia de terapia específica para toxoplasmose. Os soros dos Grupos IV e V foram gentilmente cedidos pelo Setor de Toxoplasmose do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

##### **3.2.4.2. Amostras de sangue**

Foram coletadas de cada paciente 10 ml de sangue em tubo contendo heparina sódica para isolamento de PBMC e dosagem de citocinas e 5 ml em tubo contendo EDTA para o diagnóstico molecular e imunológico.

### **3.2.5. Considerações éticas**

Todos os pacientes ou seus representantes legais incluídos neste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 1) e Comissão Científica do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (Anexo 2), Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Anexo 3) e Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (Anexo 4).

### **3.3. Animais experimentais e *T. gondii***

#### **3.3.1. Manutenção e obtenção dos parasitas**

Foram utilizados taquizoítos da cepa RH, tipo I, altamente virulenta e de multiplicação rápida (Sabin e Feldman, 1948) gentilmente cedida pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e mantidas no biotério de experimentação do Instituto Adolfo Lutz. Os parasitas foram mantidos em camundongos da linhagem Swiss, de ambos os sexos, com idade entre 25 a 30 dias, por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  parasitas/animal. Após quatro dias de infecção, os animais foram eutanaziados em câmara de CO<sub>2</sub> e foram feitas lavagens intraperitoneais com 5 mL/animal de NaCl 0,85% estéril para a retirada dos taquizoítos. Posteriormente, foi feita a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e acertada a concentração desejada. Esses parasitas foram utilizados para a manutenção da cepa através de passagem para um novo grupo de animais, para a preparação dos antígenos e infecção das culturas de células.

#### **3.3.2 Cultura de células**

Culturas de células VERO (ATCC- CCL-81), obtidas da Seção de Raiva do Instituto Butantan foram mantidas em meio VPM SFM AGT

contendo 4mM l-glutamina, 2.5 µg/ml gentamicina (Gibco-Invitrogen). A seguir, as culturas foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com 0.25% de tripsina (Invitrogen) por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a tripsina foi aspirada e as células suavemente descoladas da parede da garrafa. Subsequentemente uma nova alíquota de meio foi adicionada as células e estas contadas em câmara de Neubauer. Os subcultivos foram feitos a cada 3-4 dias, sendo as culturas mantidas em estufa 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C.

### **3.4. Produção de antígenos**

#### **3.4.1. Padronizações**

Os primeiros experimentos foram dedicados à padronização de dois antígenos provenientes de taquizoítos que foram utilizados nos ensaios para detecção da resposta imune. Foram validados o antígeno lisado de taquizoítos (ALT) e ESA, obtida de sobrenadante de culturas de células VERO infectadas. Para a otimização da produção *in vitro* de *T. gondii* em células VERO, foram analisadas condições ideais de cultura, infectividade, presença de mutações genômicas e imunogenicidade. A metodologia se encontra descrita em Costa-Silva et al., 2012 (Anexo 8).

#### **3.4.2. ALT**

Após padronizações, foram colhidas suspensões de  $2.10^7$  taquizoítos/mL provenientes de culturas de células VERO (sete dias pós-infecção) e centrifugados por 15 minutos a 1800 g. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e os parasitas foram lavados três vezes com 40 ml de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0.01M pH 7.2 por 15 minutos a 1800 g. Os taquizoítos foram rompidos por ultra-som (Sonic Dismembrator Quigley, USA) por 10 ciclos (1,0 A/min) por 5 minutos com intervalos de 2 minutos. Após a certificação da lise dos parasitas, o ALT foi dissolvido em

0.3 M NaCl e as concentrações proteicas foram determinadas. O antígeno foi alíquotado e estocado à -70°C.

### **3.4.3. ESA**

Os sobrenadantes das culturas celulares infectadas por *T. gondii* (preparados como descrito por Meira et al., 2011) foram colhidos após 48 horas de infecção, passados para tubos de 15 ml (Corning). A seguir, os parasitas foram removidos por duas centrifugações de 2800 g por 10 minutos e filtrados em membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro (MILLIPORE - USA). O sobrenadante livre de taquizoítos, contendo as ESA, foi suplementado com adição de 10 µg/mL de um coquetel de inibidores de protease contendo por mL: AEBSF 20µm; EDTA 10µm; Bestatin 1,3µm; E-64 0,14µm; Leupeptin 10 nm e Aprotinin 3 nm (Sigma) e concentrado em *Speed Vac* (RC 10.09 - Jouan) por 4 horas. O concentrado final foi colocado em saco de diálise com poros que retém moléculas com massa molecular superiores a 12 kDa (Sigma) e dialisado contra PBS pH 7.2 a 4°C por aproximadamente 18 horas.

### **3.4.4. Dosagem protéica**

As concentrações protéicas foram determinadas pela absorção da luz ultravioleta das soluções, em comprimento de onda a 280 nm, em NanoDrop ND100 (Thermo Scientific).

### **3.4.5. Eletroforese vertical das proteínas**

A eletroforese vertical foi realizada em gel de acrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) como descrita por Laemmli (1970), em equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, USA). Em todos os ensaios, o gel de separação (Tris-HCl 0.75 M; SDS 0.2%, pH 8.8) foi utilizado na concentração 10% de acrilamida. O gel de empilhamento (Tris-HCl 0,25 M; SDS 0,2%, pH

6.8) foi usado na concentração de 5%. Os géis foram feitos com espessuras de 1 mm. Os antígenos foram utilizados nas seguintes concentrações: ESA (20 µg/mL) e ALT ( $1 \times 10^7$  taquizoítos/mL) e diluídos em 50 µl de tampão de amostra (SDS 2%; glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 60 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,002%). Posteriormente, foram aquecidos por 3 minutos a 100°C e aplicados 20 µl nas canaletas do gel de empilhamento. Os eletrodos foram mergulhados no tampão contendo Tris-HCl 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1% e aplicados numa voltagem constante de 200 V. Os géis foram corados por Coomassie Azul Brilhante R250 (Sigma) 0,15%; etanol 40%; ácido acético 10% durante 20 minutos e descorados em etanol 40%; ácido acético 10% até que as bandas ficassem distinguíveis. Em todos os experimentos foram colocados na primeira canaleta do gel 10 µl do padrão de peso molecular para proteínas (5.7, 13.7, 18.3, 24.9, 35.1, 47.2, 60.4, 78.9, 109.5 e 170.8 kDa) (Bench Mark Pré-Stained Protein Ladden – Invitrogen).

### **3.5. Ensaio imunológico**

#### **3.5.1. Para resposta imune humoral**

##### **3.5.1.1. ELISA**

As reações foram realizadas utilizando-se dois antígenos: o ALT (descrito no item 3.4.2.), comumente utilizado no diagnóstico sorológico da toxoplasmose e ESA (descrito no item 3.4.3.). As reações foram realizadas em placas de poliestireno com 96 orifícios (flat bottom, low binding, Corning) e após cada segmento da reação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS 0,05%-Tween 20. Os antígenos foram diluídos em Tampão bicarbonato de sódio 0.1M pH 8.5 na concentração de 1 µg/ml para ALT e de 20 µg/ml para ESA (Meira et al., 2011) e distribuídos num volume de 50 µl/orifício. Após a incubação por cerca de dezoito horas a 4°C, os orifícios foram bloqueados com 100 µl de PBS-leite desnatado 5% por 1 hora a temperatura

ambiente. Os soros e/ou LCR diluídos em PBS-leite desnatado 5% foram então adicionados aos orifícios da placa, em duplicata, num volume de 50 µl e incubados por 60 minutos a 37°C. Seguiu-se mais um ciclo de lavagens e as placas foram incubadas com o segundo anticorpo marcado na diluição previamente padronizada em PBS-leite desnatado 5% e adicionado 50 µl/orifício por igual período. A revelação ocorreu com a adição de 100 µl do substrato enzimático contendo 0,5 mg/ml de OPD (orto-fenilenodiamina) diluído em fosfato de sódio dibásico 0,1M pH 4.5; ácido cítrico 0,1M; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% por 30 minutos em câmara escura, a 37°C. A reação foi interrompida adicionando 50 µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4 N. Os resultados gerados foram analisados por leitura em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan) em comprimento de onda de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata e o “cut-off” da reação a ser utilizado foi determinado com as médias das leituras obtidas de 20 amostras de soros de indivíduos não infectados por *T. gondii*. Na impossibilidade de se obter amostras de LCR de indivíduos saudáveis, o “cut-off” das reações de LCR foi determinado com as médias das leituras obtidas de 20 amostras de LCR de pacientes com outras doenças neurológicas e não infectados por *T. gondii*.

#### **3.5.1.1.1. Padronizações**

Todas as etapas da reação foram previamente padronizadas e as amostras de soro e/ou LCR foram testadas em duplicata. As diluições das amostras bem como do segundo anticorpo marcado com peroxidase utilizados nos ensaios estão descritos abaixo. Todas as diluições foram feitas em PBS-leite desnatado 5% (Meira et al., 2008; 2011).

##### **3.5.1.1.1.1. Para detecção de anticorpos IgG no LCR**

Para determinação dos níveis de anticorpos IgG em amostras de LCR, estas foram diluídas a 1:2 e o segundo anticorpo marcado com peroxidase anti-IgG humano foi diluído a 1:10.000.

#### **3.5.1.1.1.2. Para detecção de anticorpos IgA e IgE**

Para a detecção dos níveis de anticorpos IgA e IgE as amostras de soros foram diluídas a 1:50 e o segundo anticorpo marcado com peroxidase foi diluído a 1:5000 e 1:4000 para anti-IgA e anti-IgE humano respectivamente.

#### **3.5.1.1.1.3. Para detecção de subclasses de IgG**

Para a determinação dos níveis de subclasses de IgG as amostras de soro foram diluídas a 1:50 e as de LCR a 1:1. O segundo anticorpo marcado com peroxidase anti-IgG1 humano foi diluído a 1:500 e 1:1000 para anti-IgG2, 3 e 4.

#### **3.5.1.2. Western blotting**

A reação de western blotting foi realizada para diagnóstico de amostras de LCR. Os antígenos ESA e ALT foram fracionados em géis SDS-PAGE 10% (conforme item 3.4.5.) e transferidos para membranas de nitrocelulose (com poros de 0,45 µm de diâmetro – BioRad) no equipamento Trans-Blot System (BioRad). Após o posicionamento e montagem dos géis, a transferência foi efetuada em voltagem constante de 15 V por 60 minutos em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM; glicina 0,192 M; metanol 20%, pH 8.2). Ao final da transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas por 0,2% de Ponceau-S [ácido 3-hidroxil-4-(2-sulfo-fenilazo)-2,7-naftalenodisulfônico] (Sigma) em ácido tricloroacético 3% (Merck) por 5 minutos para confirmação da transferência efetiva das proteínas. As membranas foram, então, incubadas com PBS-leite desnatado 5% pelo período de 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação, seguidos de 3 lavagens com PBS (5 minutos). Em seguida, adicionaram-se as amostras de LCR diluídas 1:2 em PBS-leite desnatado 5% e incubadas por 1 hora a

temperatura ambiente, sob agitação. Após mais três lavagens com PBS (5 minutos), as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação com IgG de cabra anti-IgG humana conjugada a peroxidase (Sigma) na diluição de 1:500 em PBS-leite desnatado 5%, seguindo-se, então, um novo ciclo de lavagens. A revelação das bandas foi efetuada cobrindo-se as membranas em aproximadamente 5 ml de 4-cloro-1-naftol 0,3% (Sigma) em metanol; Tris-HCl 50 mM, pH 7.6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%. Após o desenvolvimento da cor desejada, o tampão foi removido e as membranas lavadas com PBS.

### **3.5.2. Para resposta imune celular**

#### **3.5.2.1. Isolamento das PBMC**

Amostras contendo 10 mL de sangue provenientes dos grupos estudados foram coletadas na presença de heparina sódica como anticoagulante, homogeneizadas e diluídas volume a volume em PBS (pH 7.4). Após homogeneização, as células foram separadas de acordo com o gradiente Histopaque 1077 (Sigma). Cada tubo de amostra diluída em PBS foi adicionada delicadamente em tubo de 15 mL contendo 3 mL de Ficoll-Hepaque 1077. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos utilizando centrífuga de baixa aceleração/desaceleração. Após esta etapa, com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, retiramos as células mononucleares contidas na fase de separação e procedemos a duas lavagens com 10 mL de PBS (pH 7.4) a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento diluído em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, 2 g/L de bicarbonato de sódio e 50 mg/mL de estreptomicina. Em seguida, procedemos à contagem das células em suspensão. Em uma alíquota de 10 µl da suspensão celular adicionamos 10 µl do corante Azul de Tripán para verificação da viabilidade celular e procedemos à contagem das células em câmara de Neubauer. Após contagem, as mesmas foram então distribuídas

em placas de cultura de 48 poços (Corning) na quantidade de  $1 \times 10^6$  células por poço para posterior estímulo.

### **3.5.2.2. Cultura e estímulos das PBMC**

A fim de se padronizar a concentração ideal dos antígenos a serem usados para estímulo celular, as células mononucleares já distribuídas em placas de 48 poços foram incubadas com diferentes concentrações de ALT e ESA (0.5, 1, 5 e 10  $\mu\text{g/poço}$ ). Para controle dos experimentos *in vitro*, em todos os ensaios realizados foram incluídos dois poços controles em duplicata (negativo e positivo). Como controle negativo, as células foram incubadas somente com meio de cultura, ao passo que, no positivo as células foram estimuladas com o proliferador mitótico Fitohemaglutinina (PHA) - Sigma (1 $\mu\text{g/poço}$ ) para produção de citocinas. Após estímulo, as células foram mantidas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. O tempo médio para a produção de citocinas variou de acordo com a citocina testada. Desta forma, para TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 os sobrenadantes foram colhidos 24 horas após estímulo e para IFN- $\gamma$  e IL-4 após 48 horas.

### **3.5.2.3. ELISA para detecção de citocinas**

Para a detecção de citocinas, após os experimentos *in vitro* descritos acima as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 e IL-4 foram dosadas nos sobrenadantes de culturas de células com o auxílio de kits específicos (Ebioscience) por ELISA, segundo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas em placas de poliestireno de 96 orifícios (flat bottom, high binding, Corning) e após cada segmento da reação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS 0,05%-Tween 20. O anticorpo de captura para cada citocina foi diluído a 1/250 em tampão Coating Buffer Powder contendo 0.01M salina tamponada com fosfato, NaCl 0.138M, KCl 0.0027M, pH 7.4 e distribuídos num volume de 100  $\mu\text{l/orifício}$ . Após incubação a 4°C overnight, os orifícios foram lavados 5 vezes (com intervalos de 1 minuto) e bloqueados

com 200 µl do tampão diluente de ensaio por 1 hora a temperatura ambiente. Seguiu-se mais um ciclo de lavagem. Os sobrenadantes de cultura de células foram então diluídos a 1/10 para IFN- $\gamma$  e IL-10, 1/4 para TNF- $\alpha$  em tampão diluente e utilizado puro para IL-12 (p70) e IL-4. Em seguida, foram adicionados aos orifícios da placa num volume de 100 µl e incubados overnight a temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram incubadas com 100 µl do anticorpo de detecção conjugado à biotina para cada citocina, diluído a 1/250 em tampão diluente. Seguiu-se mais um ciclo de lavagem e as placas foram incubadas com a enzima avidina diluída à 1/250 a temperatura ambiente por 30 minutos. Após lavagem, adicionou-se 100 µl por orifício do substrato TMB, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida adicionando 50 µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 N. Os resultados gerados foram analisados por leitura em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan) em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados expressos em D.O (densidade óptica) foram convertidos em pg/mL a partir de uma curva de concentração feita com um anticorpo recombinante sabidamente conhecido que integrava o kit. O limite de detecção para cada teste foram de 2 pg/mL para IL-10 e IL-4 e 4 pg/mL para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12.

### 3.5.3. Análise de dados

Para os experimentos de resposta imune humoral, a partir do cálculo do “cut-off” foi calculado o Valor Relativo (VR), que representa o quociente entre a absorbância demonstrada pela amostra e a absorbância do “cut-off” obtido pelos controles negativos dos ensaios (D.O. do soro ou LCR / D.O. cut-off). As amostras que apresentaram média superior ao “valor relativo” (>1) foram consideradas positivas ao passo que aquelas que apresentaram média inferior (<1) foram consideradas negativas (Pereira-Chiocola et al., 2003; Borges, 2005; Meira et al., 2008). A análise estatística foi feita pelos seguintes métodos: Teste F e “*T de Student*” por análise bicaudal não pareada.

Nos experimentos de resposta imune celular, para comparação entre os diferentes grupos utilizamos o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. As variáveis dentro de um mesmo grupo foram comparadas pelo teste de *Wilcoxon*. Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Otimização da produção *in vitro* da cepa RH de *T. gondii* em células VERO

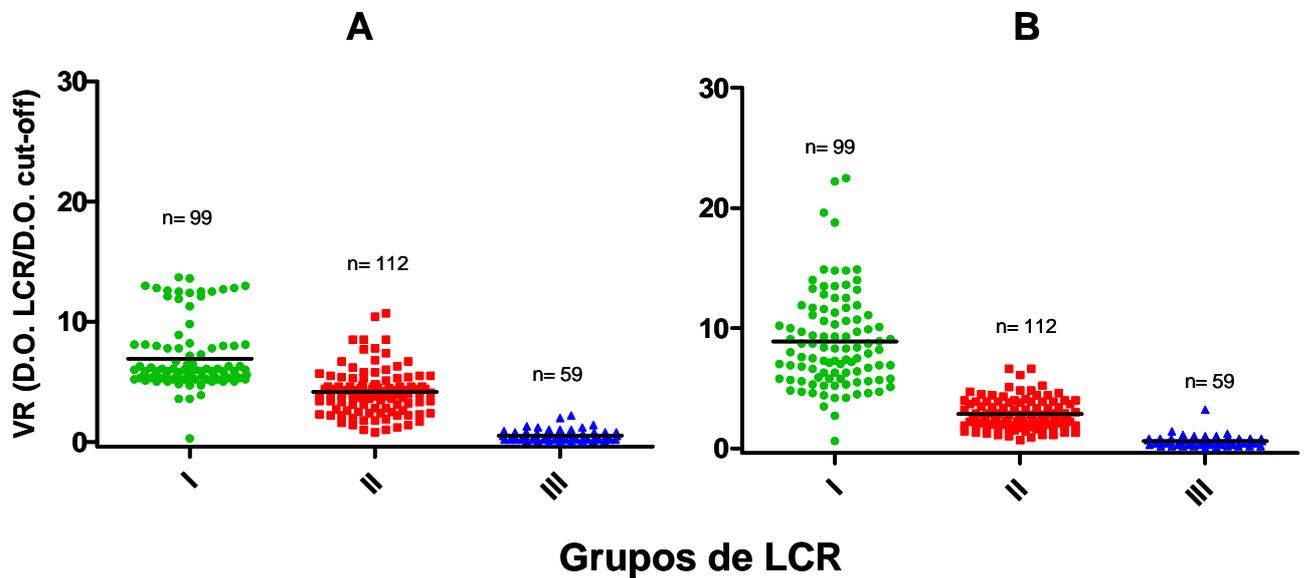
Na padronização da produção de *T. gondii* em culturas de células VERO livres de SFB, as condições ideais de cultura foram avaliadas através da determinação da concentração ideal de células para formação da monocamada celular, a qual foi de  $1 \times 10^6$  células VERO após 96 horas. A maior recuperação de taquizoítos foi de  $2.1 \times 10^7$  após sete dias de infecção utilizando um inóculo inicial de  $1.5 \times 10^6$  taquizoítos. Os experimentos também mostraram que os parasitas mantiveram a mesma infectividade durante 30 passagens em culturas e não houve alteração na composição antigênica comprovada pela ausência de mutações durante tais passagens. Os resultados encontram-se descritos em Costa-Silva et al., 2012 (Anexo 8).

## 4.2. Reatividade de anticorpos IgG em amostras de LCR de pacientes com TC/Aids frente aos antígenos ALT e ESA

### 4.2.1. ELISA

Os resultados para as amostras de LCR utilizando o ALT como antígeno são mostrados na Figura 5A. A média de VR  $\pm$  DP para os pacientes com TC/Aids (Grupo I) e pacientes com outras doenças neurológicas e soropositivos para toxoplasmose (Grupo II) foram  $7.0 \pm 0.27$  e  $3.9 \pm 0.19$ , respectivamente. A análise estatística utilizando o Teste *T Student* e *Teste F* foram feitos para determinar se o ATL foi capaz em distinguir amostras de LCR de pacientes com a infecção ativa (Grupo I) dos crônicos (Grupo II). Como mostra a Tabela 1, a análise de variância revelou que os resultados de ambos os grupos foram estatisticamente diferentes ( $1.80$ ,  $p= 0.0025$ ). A diferença entre a média de resultados foi  $3.0 \pm 0.3$  e o valor do teste *T Student* foi  $9.41$  ( $p= 0.0001$ ). Os valores para as amostras do Grupo III (pacientes com outras doenças neurológicas e negativos para toxoplasmose) foram  $0.5 \pm 0.09$ .

Em paralelo, as mesmas amostras foram testadas em ESA-ELISA (Figura 5B). As médias de VR  $\pm$  DP para as amostras de LCR do Grupo I foi  $9.0 \pm 0.39$ . Em contraste, as amostras do Grupo II mostraram uma média de  $2.7 \pm 0.12$ . Em concordância com o antígeno anterior, a análise de variância também mostrou que os resultados de ambos os grupos de pacientes foram estatisticamente diferentes ( $9.16$ ,  $p<0.0001$ ). Entretanto, em ESA, a diferença entre a média de resultados foi mais alta ( $6.2 \pm 0.39$ ) e o valor do Teste *T Student* foi  $16.04$  ( $P < 0.0001$ ). A média de VR do grupo controle (Grupo III) foi  $0.4 \pm 0.22$ .



**Figura 5.** ELISA: Reatividade imunológica ao antígeno ALT (A) e ESA (B) utilizando amostras de LCR. As amostras são provenientes de pacientes com Aids, divididas em: TC/Aids (Grupo I), soropositivos para toxoplasmose e com outras doenças neurológicas (Grupo II) e soronegativos para toxoplasmose e com outras doenças neurológicas (Grupo III). Os resultados estão expressos em VR (D.O. LCR/ D.O. cut-off). Valores >1 foram considerados reativos. As linhas horizontais representam as médias aritméticas de cada grupo.

**Tabela 1.** Análise estatística das diferenças entre os Grupo I (TC/Aids) e Grupo II (soropositivos para *T. gondii*). Resultados de ELISA utilizando os antígenos ALT e ESA.

| <b>Teste estatístico</b>                     | <b>ALT</b>              | <b>ESA</b>              |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Grupo I ( <i>n</i> = 99)                     | 7,0 ± 0,27 <sup>a</sup> | 9,0 ± 0,39 <sup>a</sup> |
| Grupo II ( <i>n</i> = 112)                   | 3,9 ± 0,19 <sup>a</sup> | 2,7 ± 0,12 <sup>a</sup> |
| Teste <i>T</i> não pareado (bicaudal)        | 9,41                    | 16,04                   |
| Valor de <i>P</i>                            | 0,0001                  | <0,0001                 |
| Diferença entre médias                       | 3,0 ± 0,32 <sup>a</sup> | 6,2 ± 0,39 <sup>a</sup> |
| Intervalo de Confiança 95%                   | 2,4 a 3,7               | 5,5 a 7,0               |
| <i>R</i> <sup>2</sup>                        | 0,30                    | 0,55                    |
| Teste <i>F</i> (para comparar as variâncias) | 1,8 <sup>b</sup>        | 9,16 <sup>b</sup>       |
| Valor de <i>P</i>                            | 0,0025                  | <0,0001                 |

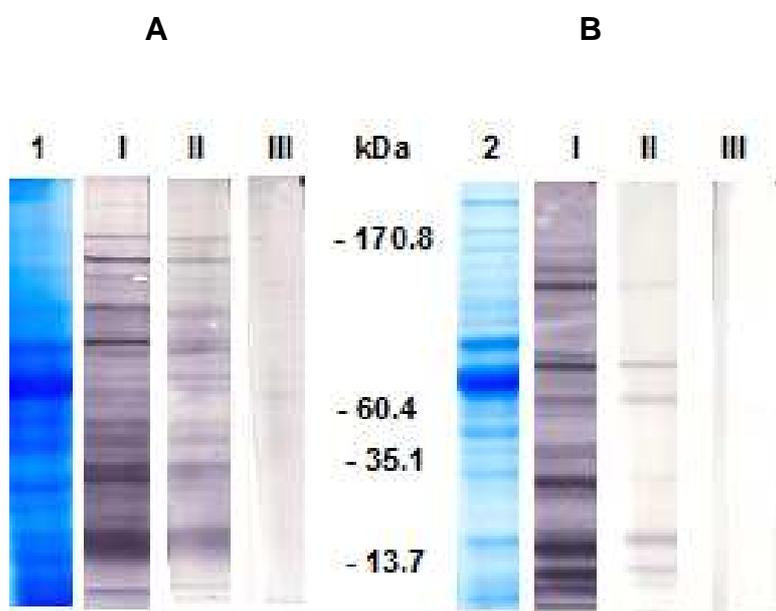
<sup>a</sup> Valores expressos como média ± DP.

<sup>b</sup> As variâncias são significativamente diferentes em ambos os grupos.

#### 4.2.2. Western Blotting

As amostras de LCR também foram ensaiadas por western blotting. Como esperado, amostras de ambos os Grupos I e II foram reativas com o ALT com similares intensidades (Figura 6A).

Em paralelo, utilizando a ESA (Figura 6B), amostras de LCR do Grupo I reagiram bem com ESA (strip I), já as amostras do Grupo II (strip II) apresentaram menor reatividade.



**Figura 6.** Western Blotting: Reatividade imunológica ao antígeno ALT (A) e ESA (B) utilizando amostras de LCR. ALT (A1) e ESA (B2) foram separados por SDS-PAGE 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As amostras de LCR de cada grupo de pacientes divididas em: TC/Aids (Grupo I), soropositivos para toxoplasmose e com outras doenças neurológicas (Grupo II) e soronegativos para toxoplasmose e com outras doenças neurológicas (Grupo III) foram incubadas com as membranas.

### 4.3. Subclasses de IgG em amostras de soro e LCR envolvidas na infecção

Como mostra a Figura 7, utilizando o ALT, altos níveis de IgG1 foram observados nas amostras de soros do Grupo I (TC/Aids), Grupo II (outras neuroinfecções, Aids e soropositivos para toxoplasmose) e Grupo IV (HIV negativo e soropositivo para toxoplasmose) com médias de VR de 8.4 ( $\pm$  0.42), 8.3 ( $\pm$  0.44) e 7.5 ( $\pm$  0.21) respectivamente. Tais médias não foram estatisticamente significantes ( $p>0.05$ ). Nestes grupos, não foram detectados níveis de IgG2, 3 e 4.

Em contrapartida, utilizando ESA (Figura 8), foi obtido um perfil de subclasses distinto em comparação com o antígeno anterior. Níveis menores de IgG1 foram observados nos Grupos I, II e IV, com médias de valor relativo de 6.2 ( $\pm$  0.49), 4.0 ( $\pm$  0.35) e 1.5 ( $\pm$  0.21) respectivamente. Ao compararmos os três grupos, verificou-se diferenças estatisticamente significantes ( $p<0,05$ ). Em adição, no grupo de pacientes com TC/Aids (Grupo I) foi observada uma produção de IgG4 com média de VR de 2.5 ( $\pm$  0.21) e uma alta produção de IgG2 no Grupo IV (HIV negativo e soropositivo para toxoplasmose) com média de VR de 3.5 ( $\pm$  0.35). Para ambos os grupos, tais valores foram estatisticamente significantes ( $p<0,05$ ).

Não foram detectados níveis de subclasses de IgG nas amostras de soros dos Grupos III e V utilizando ambos os antígenos (VR < 1).

Em adição, o perfil de subclasses de IgG em amostras de LCR também foram avaliados. Como mostram as Figura 9 e 10, os resultados encontrados corroboram com os achados nas amostras de soro.

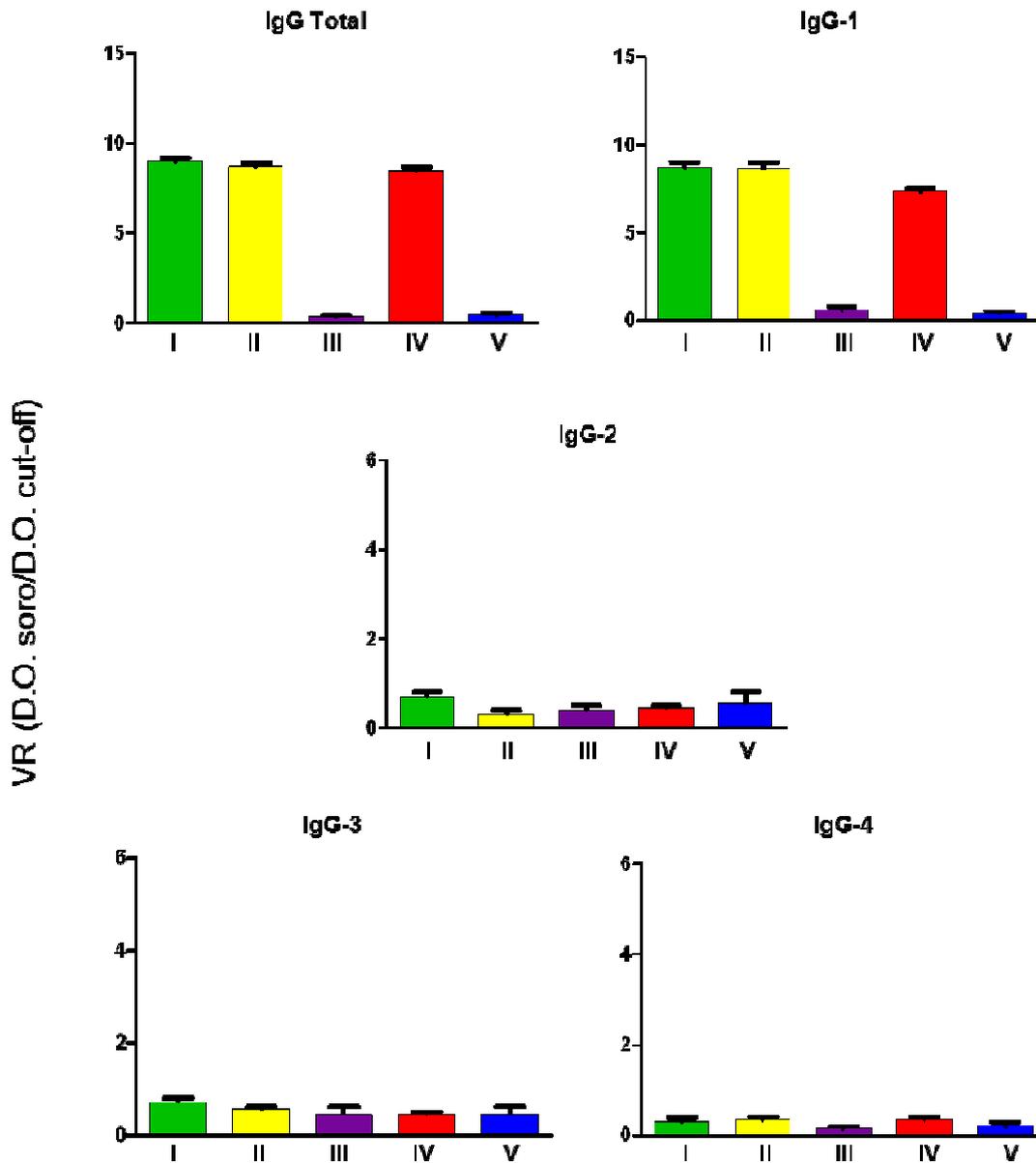
Utilizando o ALT (Figura 9) observa-se altos níveis de IgG1 nos Grupos I (TC/Aids) e II (outras neuroinfecções, Aids e soropositivos para toxoplasmose) com médias de VR de 5.5 ( $\pm$  0.25) e 4.0 ( $\pm$  0.40) respectivamente. Tais valores não foram estatisticamente significantes ( $p>0.05$ ). Nestes grupos, não se detectou níveis de IgG2, 3 e 4.

Por outro lado, quando utilizamos ESA (Figura 10), foi possível detectar níveis de IgG4 nos pacientes com TC/Aids (Grupo I), bem como

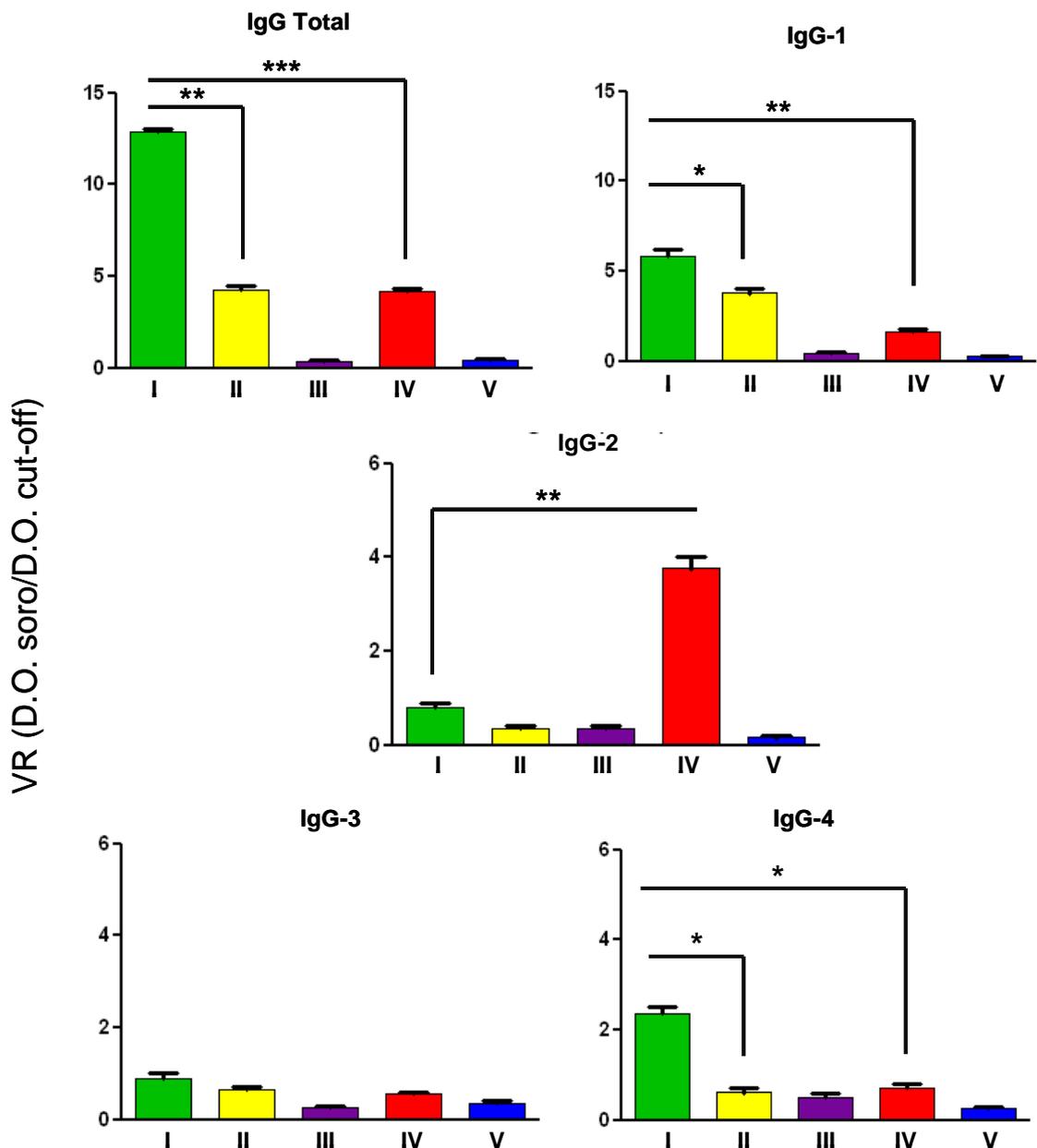
níveis de IgG2 nos pacientes do Grupo II, com médias de VR de 1.9 ( $\pm$  0.26) e 2.0 ( $\pm$  0.10) respectivamente. Para ambos os grupos, tais valores foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). Níveis de IgG1 também foram encontrados, sendo de 3.1 ( $\pm$  0.41) para o Grupo I e 2.3 ( $\pm$  0.28) para o Grupo II, porém tais valores não foram estatisticamente significantes ( $p > 0.05$ ).

Não foram detectados níveis de subclasses de IgG nas amostras de LCR do Grupo III utilizando ambos os antígenos (VR < 1).

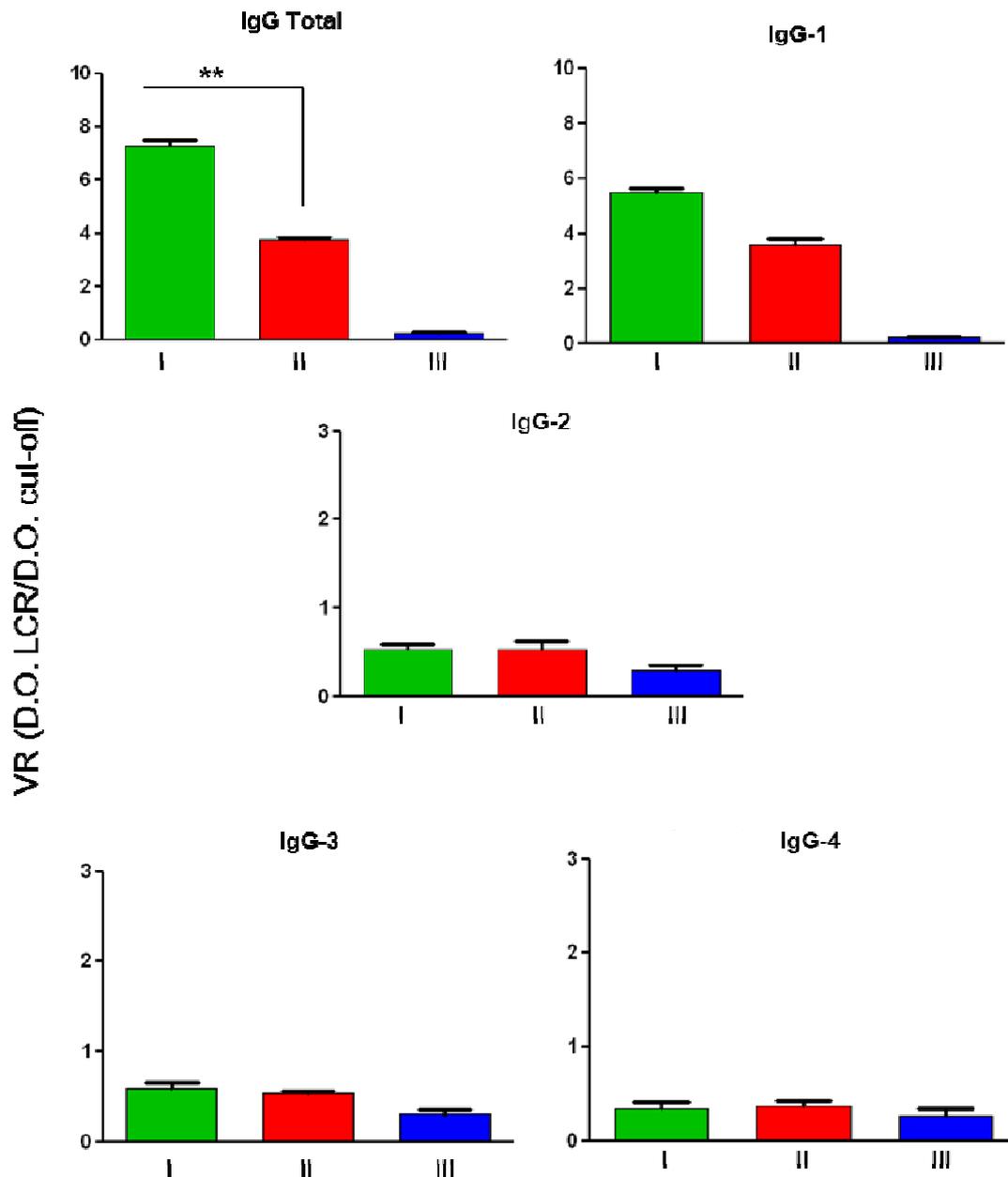
Observação: Para efeito de comparação, adicionamos aqui os resultados de IgG total obtidos por ELISA tanto para amostras de soro e LCR utilizando ambos os antígenos (ALT e ESA).



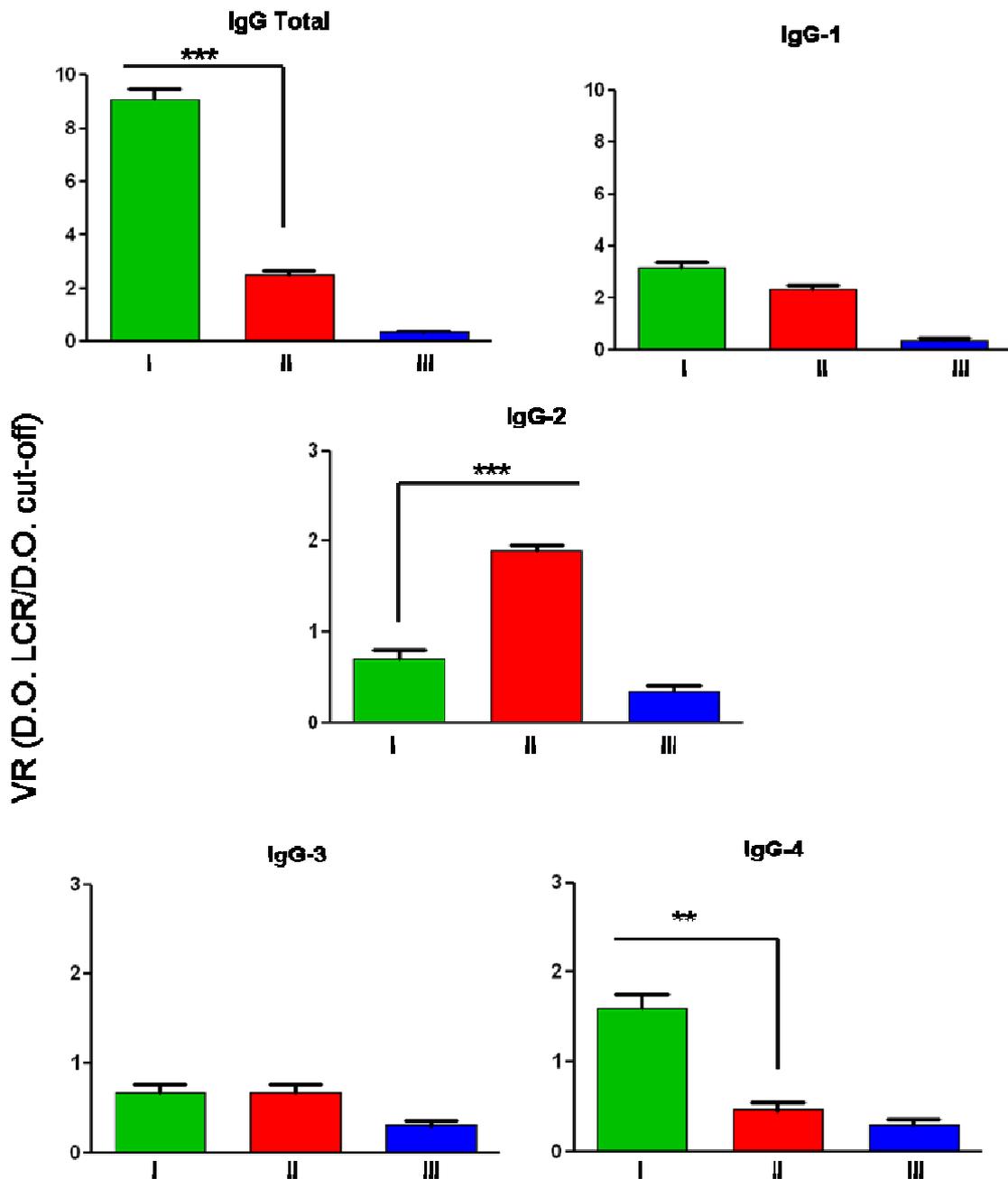
**Figura 7.** ELISA: Reatividade de anticorpos subclasses de IgG frente ao antígeno ALT em amostras de soros dos grupos de pacientes com: TC/Aids (I), outras neuroinfecções/Aids/soropositivos para toxoplasmose (II), outras neuroinfecções/Aids/soronegativos para toxoplasmose (III); HIV negativo e soropositivo para toxoplasmose (IV); e HIV negativo e soronegativo para toxoplasmose (V). Os resultados estão expressos em VR (D.O.soro/D.O.cut-off). Valores >1 foram considerados reativos.



**Figura 8.** ELISA: Reatividade de anticorpos subclasses de IgG frente ao antígeno ESA em amostras de soros dos grupos de pacientes com: TC/Aids (I), outras neuroinfecções/Aids/soropositivos para toxoplasmose (II), outras neuroinfecções/Aids/soronegativos para toxoplasmose (III); HIV negativo e soropositivo para toxoplasmose (IV); e HIV negativo e soronegativo para toxoplasmose (V). Os resultados estão expressos em VR (D.O. soro/ D.O. cut-off). Valores >1 foram considerados reativos. Comparação das reatividades entre os grupos por teste T (95% de intervalo de confiança \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).



**Figura 9.** ELISA: Reatividade de anticorpos subclasses de IgG frente ao antígeno ALT em amostras de LCR dos grupos de pacientes com: TC/Aids (I), outras neuroinfecções/Aids/soropositivos para toxoplasmose (II) e outras neuroinfecções/Aids/soronegativos para toxoplasmose (III). Os resultados estão expressos em VR (D.O. LCR/ D.O. cut-off). Valores >1 foram considerados reativos. Comparação das reatividades entre os grupos por teste T (95% de intervalo de confiança \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).



**Figura 10.** ELISA: Reatividade de anticorpos subclasses de IgG frente ao antígeno ESA em amostras de LCR dos grupos de pacientes com: TC/Aids (I), outras neuroinfecções/Aids/soropositivos para toxoplasmose (II) e outras neuroinfecções/Aids/soronegativos para toxoplasmose (III). Os resultados estão expressos em VR (D.O. LCR/ D.O. cut-off). Valores >1 foram considerados reativos. Comparação das reatividades entre os grupos por teste T (95% de intervalo de confiança \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).

#### **4.4. Reatividade de anticorpos IgA e IgE em amostras de soro envolvidas na infecção**

Com o objetivo de evidenciar o perfil da resposta imune humoral desencadeada por ALT e ESA, foram avaliados os níveis de IgA e IgE nos grupos de soros estudados, uma vez que na toxoplasmose cerebral o valor diagnóstico de tais imunoglobulinas não é bem estabelecido.

Não foram detectados níveis de IgA e IgE em nenhum dos grupos de soros estudados, utilizando ambos os antígenos. Sabemos que estes anticorpos frequentemente aparecem nos estágios iniciais da infecção, porém nossos achados sugerem que estes não persistem na reativação.

## **4.5. Produção de citocinas**

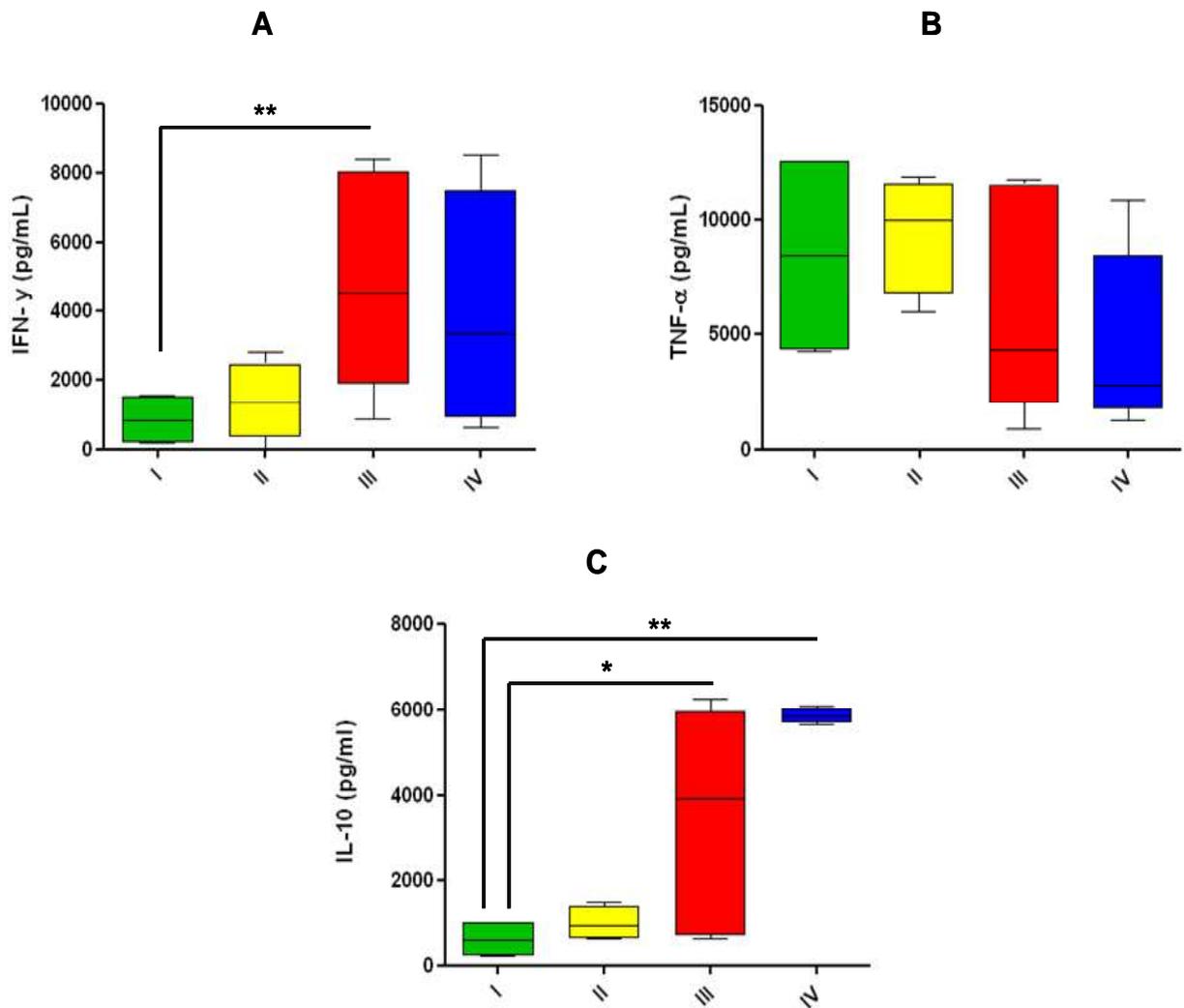
### **4.5.1. Estímulos de PBMC, padronizações:**

As células mononucleares do sangue periférico dos quatro grupos de pacientes: TC/Aids (grupo I), toxoplasmose cerebral prévia tratada (grupo II), soropositivos para toxoplasmose (grupo III) e soronegativos para toxoplasmose (grupo IV) após isolamento foram estimuladas com ALT e ESA nas concentrações de 0.5, 1, 5 e 10 µg/ poço. Para as citocinas avaliadas, a concentração ótima de ambos os antígenos para estímulo foi de 5 µg/poço e de 1 µg/poço para ESA e ALT respectivamente. Estas concentrações foram utilizadas em todos os experimentos.

O proliferador mitótico Fitohemaglutinina (PHA) foi satisfatório para avaliação da viabilidade celular, funcionando como controle positivo para a detecção das citocinas (Figura 11). Nota-se que, em relação à produção de IFN- $\gamma$  (A), mediante estímulo com PHA, células mononucleares de indivíduos soropositivos (Grupo III) e soronegativos (Grupo IV) para toxoplasmose apresentaram grande produção desta citocina, o que não foi observado em pacientes com TC/Aids (Grupo I) e com toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II). Ao compararmos estatisticamente os grupos, observamos que tais diferenças foram significantes entre os Grupos I e III ( $p < 0.005$ ).

PHA também foi efetivo na produção de TNF- $\alpha$  (B), uma vez que todos os grupos apresentam uma grande produção desta citocina, embora sem diferenças estatisticamente significantes entre eles ( $p > 0.005$ ).

Quanto à produção de IL-10 (C), semelhante aos resultados obtidos com IFN- $\gamma$ , altos níveis foram detectados nos Grupos III e IV mediante estímulo com PHA, o que não foi observado em pacientes com TC/Aids (Grupo I) e com toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II). No entanto, diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre os grupos I, III e IV ( $p < 0.005$ ).



**Figura 11.** ELISA: Produção de IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de culturas de PBMC de pacientes com: TC/Aids (Grupo I), toxoplasmose cerebral prévia tratada (grupo II), soropositivos para toxoplasmose (Grupo III) e negativos para toxoplasmose (Grupo IV) estimulados com PHA. Comparação das reatividades entre os grupos pelo teste de *Mann-Whitney* (95% de intervalo de confiança \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).

#### **4.5.2. Detecção de citocinas**

Os resultados apresentados neste item consideraram apenas a 1<sup>o</sup> coleta dos pacientes com TC/Aids, visto que os resultados das demais coletas/monitoramento serão apresentados no próximo tópico.

##### **4.5.2.1. IFN- $\gamma$**

Com relação à produção de IFN- $\gamma$ , foi verificado que altos níveis desta citocina foram produzidos em amostras de indivíduos soropositivos para toxoplasmose (Grupo III) utilizando tanto o ALT (Figura 12A) quanto ESA (Figura 13A). No entanto, uma produção maior e estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ), foi observada quando utilizamos o primeiro antígeno.

Em adição, mediante estímulo com ambos os antígenos, verificou-se que pacientes com TC/Aids (Grupo I) tem uma deficiência na produção de IFN- $\gamma$ , o que já não é observado nos pacientes com toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II). Ao compararmos esta produção deficiente à dos indivíduos soropositivos para toxoplasmose (Grupo III) e pacientes com toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II), observamos que esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

##### **4.5.2.2. TNF- $\alpha$**

Altos níveis desta citocina foram encontrados nas amostras de pacientes com TC/Aids (Grupo I) ao passo que, níveis menores foram detectados nos pacientes com toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II). No entanto, uma produção maior quando utilizamos o ALT (Figura 12B) em relação à ESA (Figura 13B) foi observada, porém sem diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0.05$ ).

Indivíduos soropositivos e soronegativos para toxoplasmose apresentaram níveis estatisticamente menores de TNF- $\alpha$  utilizando ambos os antígenos ( $p < 0.05$ ), do que os pacientes com TC/Aids.

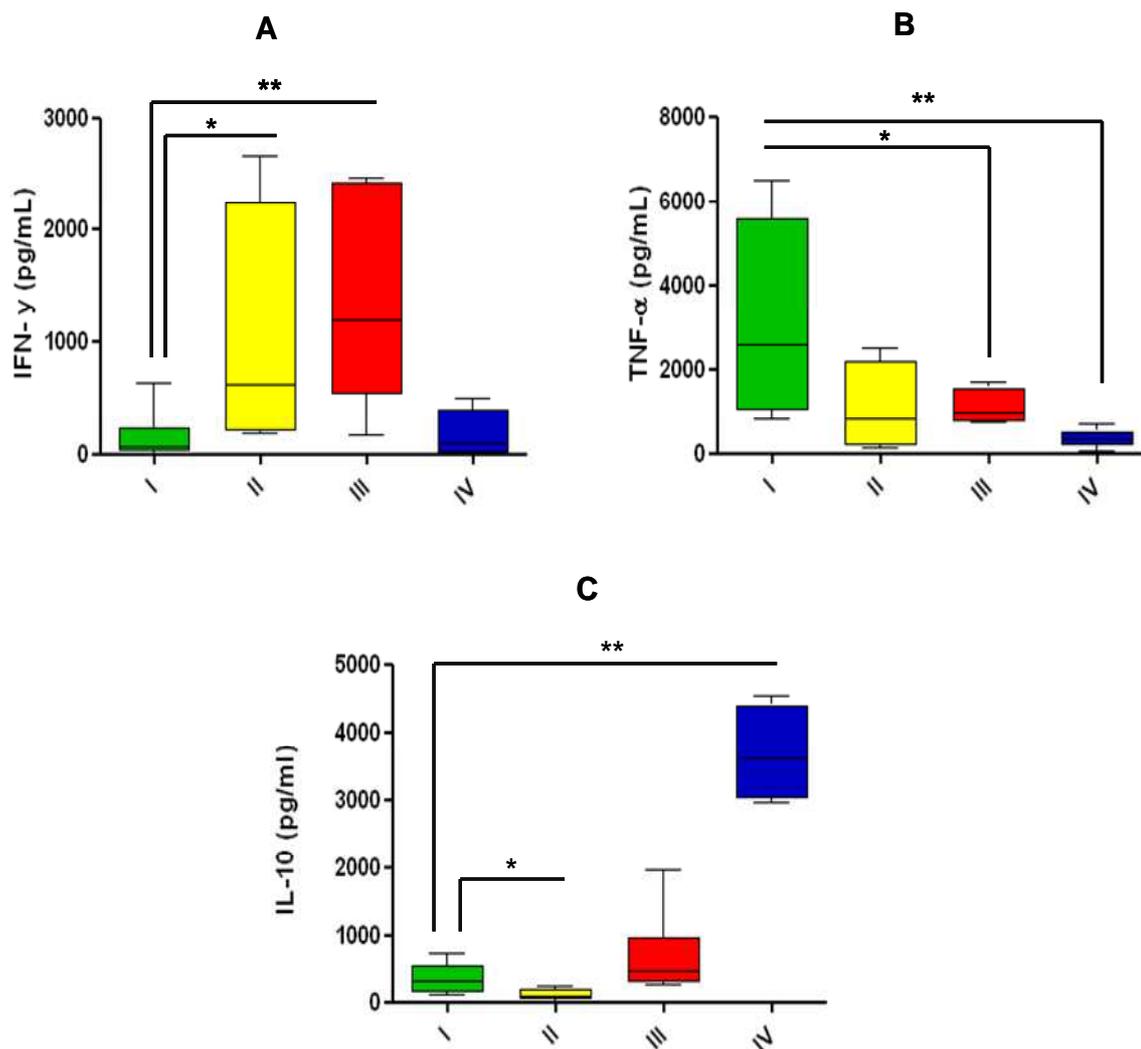
#### **4.5.2.3. IL-10**

Em adição, os níveis de IL-10 nos diferentes grupos também foram avaliados. Observamos uma pequena produção desta citocina nos pacientes com TC/Aids (Grupo I) e naqueles com toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II) e níveis um pouco mais elevados em indivíduos soropositivos para toxoplasmose (Grupo III), utilizando ambos os antígenos (Figura 12 e 13C). Ao compararmos estes grupos, observamos que há diferenças estatisticamente significantes somente entre os grupos I e II ( $p < 0.05$ ).

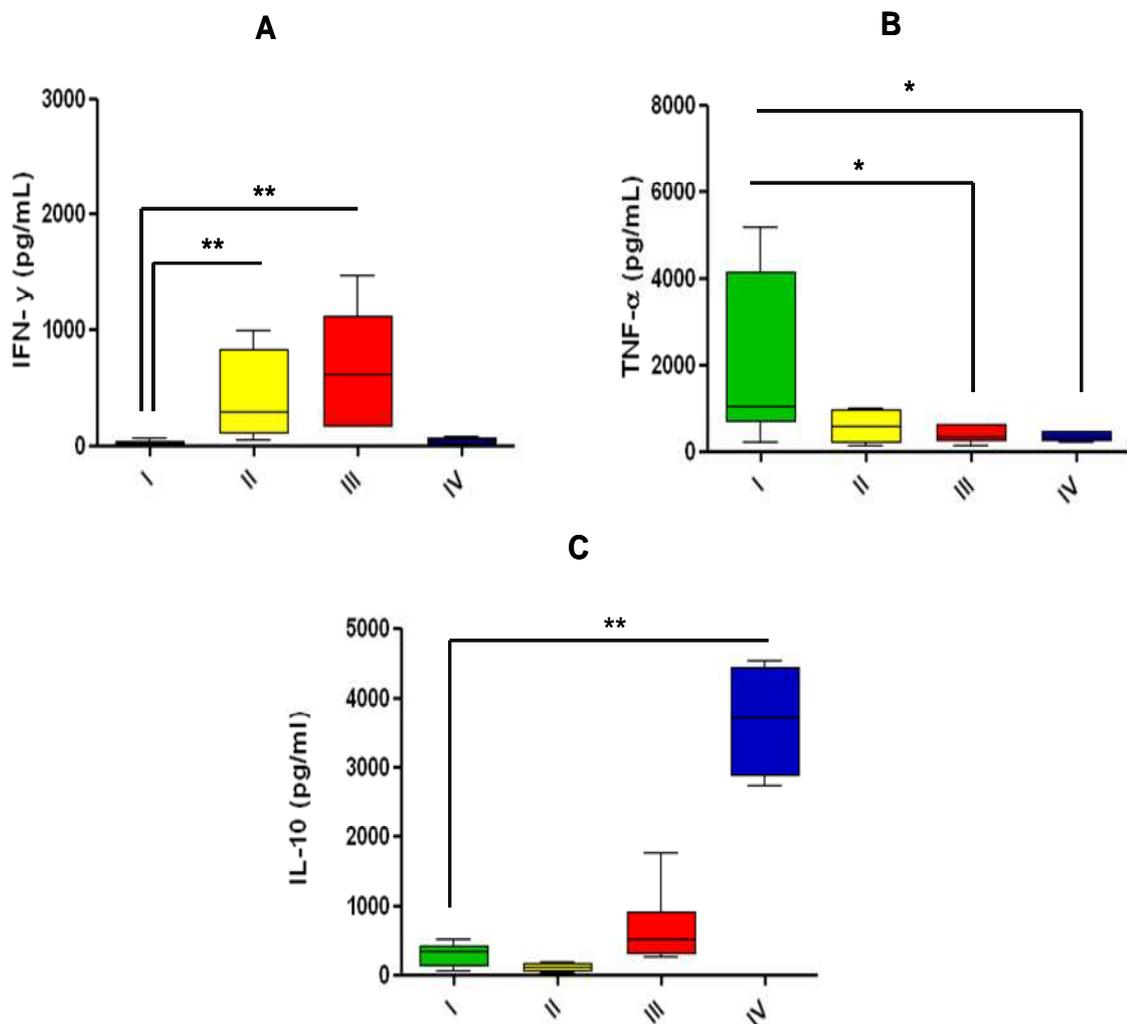
Interessantemente, uma grande produção de IL-10 nos indivíduos soronegativos para *T. gondii* e HIV (Grupo IV) foram observadas em comparação com os demais grupos.

#### **4.5.2.4. IL-4 e IL-12**

Níveis de IL-4 e IL-12 não foram detectados em nenhum dos grupos estudados, mediante estímulo com ambos os antígenos.



**Figura 12.** ELISA: Produção de IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de culturas de PBMC de pacientes com: TC/Aids (Grupo I), toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II), soropositivos para toxoplasmose (Grupo III) e negativos para toxoplasmose (Grupo IV) estimulados com ALT. Comparação das reatividades entre os grupos pelo teste de *Mann-Whitney* (95% de intervalo de confiança \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).



**Figura 13.** ELISA: Produção de IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de culturas de PBMC de pacientes com: TC/Aids (Grupo I), toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II), soropositivos para toxoplasmose (Grupo III) e negativos para toxoplasmose (Grupo IV) estimulados com ESA. Comparação das reatividades entre os grupos pelo teste de *Mann-Whitney* (95% de intervalo de confiança \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).

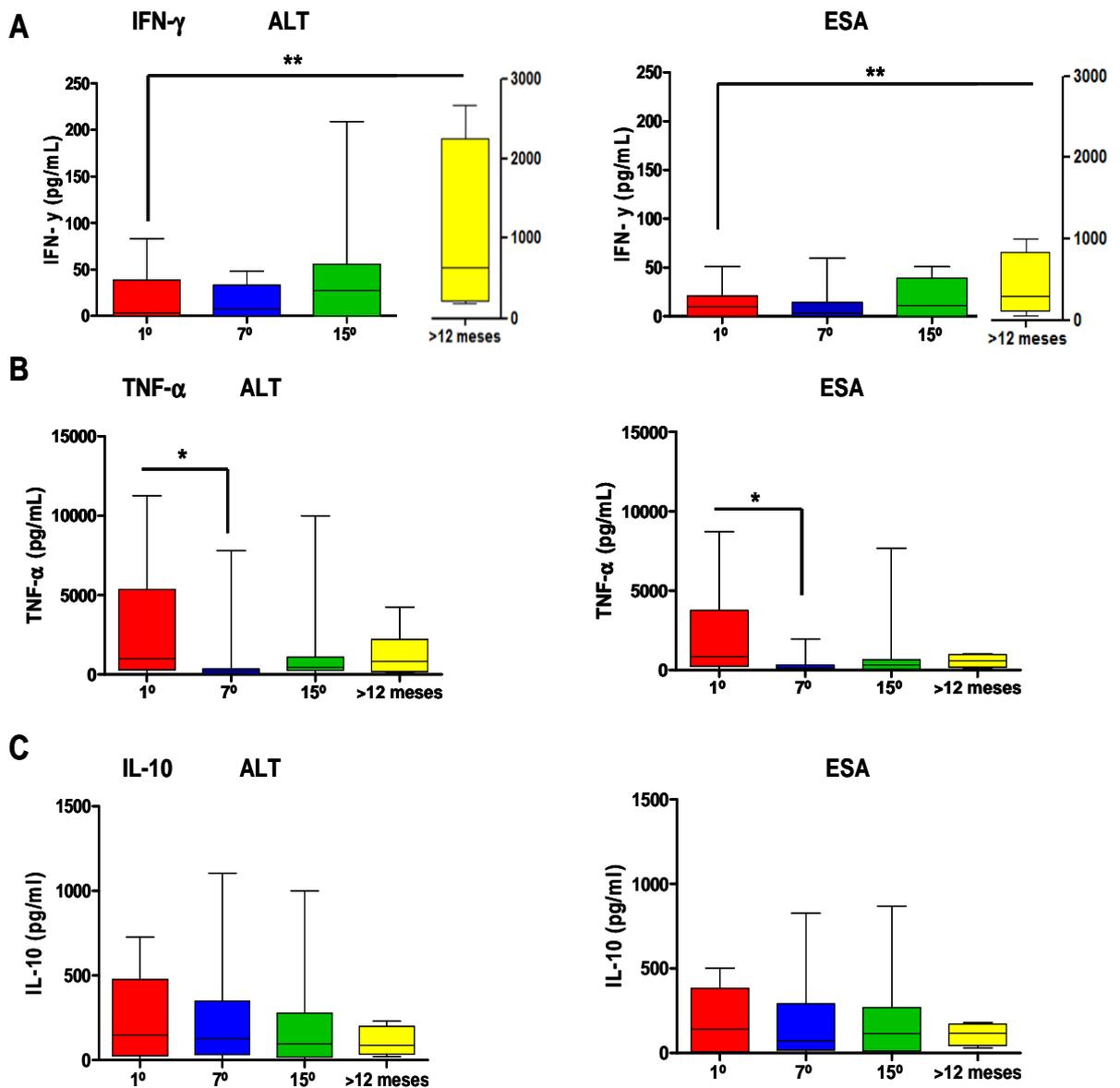
### 4.5.3. Monitoramento dos níveis de citocinas dos pacientes TC/Aids durante o tratamento

O monitoramento durante o tratamento da TC/Aids compreendeu a análise de três amostras de cada paciente com diferentes intervalos (antes, 7 e 15 dias pós-tratamento específico para *T. gondii*). Foram incluídos neste grupo, amostras de pacientes com toxoplasmose cerebral prévia tratada a mais de um ano conforme descrição no item 3.2.2.1.

Os resultados encontram-se na Figura 14. Em A, observa-se a produção de IFN- $\gamma$ . Nota-se que, com a evolução do tratamento, no 15<sup>o</sup> dia há um aumento de IFN- $\gamma$  quando comparado à produção do 1<sup>o</sup> dia de coleta. No entanto, tal produção não foi estatisticamente significativa ( $p>0.05$ ). Importante ressaltar que este aumento foi observado em 53% dos pacientes ao passo que os demais mantiveram esta citocina a níveis indetectáveis durante os 15 dias de acompanhamento. Interessantemente, os pacientes com toxoplasmose cerebral tratada a mais de um ano, apresentaram aumento estatisticamente significativo dos níveis desta citocina quando comparadas a primeira coleta do grupo anterior ( $p<0.05$ ).

Em contrapartida, conforme a evolução do tratamento observou-se uma redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  (B), entre o 1<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia utilizando ambos os antígenos ( $p<0.05$ ). No entanto, tal diminuição ocorreu somente em 73% dos pacientes. Níveis baixos desta citocina também foram encontrados nos pacientes com toxoplasmose cerebral prévia tratada.

Em IL-10 (C), observou-se uma discreta diminuição na sua produção utilizando ambos os antígenos para estímulo celular. Tal diminuição foi observada em 67% dos pacientes e naqueles com toxoplasmose cerebral tratada. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p>0.05$ ).



**Figura 14.** ELISA: Produção de IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes TC/Aids de três coletas divididas em: 1<sup>o</sup> dia (sem tratamento), 7<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia pós-tratamento. Pacientes com toxoplasmose cerebral tratada (>12 meses). Foram utilizados para estímulo os antígenos ALT e ESA. A comparação das reatividades entre as coletas foi feita pelo teste de *Wilcoxon* (95% de intervalo de confiança \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A primeira parte deste trabalho foi dedicada ao aperfeiçoamento da produção de taquizoítos em culturas de células VERO sem adição de SFB, visto que os dois antígenos (ESA e ALT) utilizados durante o estudo foram feitos a partir de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, a qual rotineiramente tem sido mantida via passagem intraperitoneal em camundongos em muitos centros de referência (Costa-Silva et al., 2008; Lee et al., 2008; Ferreira da Silva et al., 2009; Lynch et al., 2009; Degirmenci et al., 2011).

A manutenção de antígenos em contínuas passagens em culturas de células produz taquizoítos viáveis com coletas regulares, sendo uma alternativa relevante (Evans et al., 1999). Dentro desta proposta, avaliamos se taquizoítos mantidos em culturas de células VERO que crescem sem adição de SFB, são capazes de manter as suas propriedades antigênicas, mesmo após várias passagens, em relação a antígenos mantidos em animais experimentais. Como mencionamos, os resultados mostraram mesma eficiência da cultura celular em relação a animais e culturas com adição de SFB para a produção destes antígenos e são apresentados no manuscrito “*Toxoplasma gondii* antigens: Recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium” (Anexo 8).

Padronizados os antígenos, partimos para os próximos objetivos deste estudo direcionados ao valor diagnóstico da ESA em amostras de LCR e aos aspectos a cerca da imunidade na TC/Aids. Como já foi dito, o diagnóstico da toxoplasmose cerebral apresenta limitações. Com o objetivo de contribuir com o emprego de diferentes antígenos, realizamos o diagnóstico destes pacientes em amostras de LCR utilizando a ESA, em comparação com o antígeno lisado de taquizoítos (ALT), na tentativa de analisar a utilidade da ESA na detecção do nível de anticorpos presentes em diferentes materiais biológicos.

A maioria das lesões expansivas do SNC detectadas em pacientes com Aids são atribuídas a reativação da infecção latente por *T. gondii* causada por severa imunossupressão (Luft e Remington, 1992). O diagnóstico definitivo de tais lesões requer técnicas sofisticadas ou

procedimentos não invasivos que não são livres de risco. Nos últimos anos, métodos moleculares e imunológicos para a detecção de antígenos circulantes de *T. gondii* ou anticorpos específicos têm sido testados na tentativa de estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com Aids (Luft et al., 1993; Fachado et al., 1994; Collazos, 2003; Pereira-Chiocola et al., 2009). Estes estudos mostraram que mais do que 50% dos pacientes com toxoplasmose cerebral apresentam anticorpos específicos no LCR, uma vez que a ruptura da barreira hemato-encefálica devido a qualquer tipo de etiologia pode ser acompanhada por transferência passiva de anticorpos do soro para o LCR. Outro fator que deve ser considerado é que a encefalite por *T. gondii* é primariamente uma infecção parênquimal, onde a capacidade de se detectar um aumento da produção intratecal de anticorpos dependerá da proximidade da lesão das meninges (Potasman et al., 1988; Luft et al., 1993; Patel et al., 1993; Borges e Figueiredo, 2004a).

A capacidade da ESA como marcador sorológico para o diagnóstico da toxoplasmose cerebral tem sido demonstrada, uma vez que estas são liberadas por taquizoítos, a forma responsável pela disseminação da infecção. Em adição, ESA desempenha um papel importante em estimular a resposta humoral e celular para o controle da infecção (Cérède et al., 2005; Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2008, 2012). Pacientes com toxoplasmose cerebral têm altos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* com alta avidéz (Mechain et al., 2000; Colombo et al., 2005). Nesta fase, taquizoítos são liberados de cistos quiescentes e uma considerável proporção de antígenos excretados/secretados são liberados, provocando a resposta imune específica à ESA (Pereira-Chiocola et al., 2009). Quando utilizamos ESA como antígeno (em ELISA ou western blotting), amostras de LCR de pacientes com a doença ativa tinham títulos mais elevados do que aqueles com outras doenças neurológicas.

Indivíduos com toxoplasmose latente permanecem assintomáticos. Apesar da presença de anticorpos anti-*T. gondii*, estes não apresentam ou apresentam em baixo número taquizoítos circulantes. Em geral, estes

anticorpos são determinados na sorologia convencional, usando como antígeno o ALT, o qual consiste de componentes citoplasmáticos e de membrana. Amostras de LCR de pacientes com toxoplasmose cerebral e daqueles com outras doenças neurológicas diferem muito pouco em reatividade quando o ALT foi usado na reação de ELISA. Entretanto, no western blotting a reatividade foi similar. Todos estes dados em conjunto confirmam estudos prévios com amostras de soro (Meira et al., 2008), onde o antígeno ALT, largamente utilizado no diagnóstico convencional, falhou em distinguir ambos os grupos de pacientes. Por outro lado, ESA foi capaz de distinguir a infecção ativa da assintomática tanto em amostras de soro como de LCR.

Entretanto, para uma proporção de pacientes com toxoplasmose cerebral é contra-indicado a realização da punção lombar devido a uma ou mais lesões cerebrais expansivas. Nestes pacientes, ambas as ferramentas imunológicas e moleculares não podem ser usadas em amostras de LCR, refletindo a dificuldade de se obter um diagnóstico precoce e menos invasivo e a necessidade de contínuos esforços para avaliar metodologias alternativas para uso no diagnóstico. ESA em ELISA ou western blotting utilizando amostras de LCR pode ser empregada para o diagnóstico da toxoplasmose cerebral em associação com informações clínicas, sorológicas e radiológicas, constituindo-se numa ferramenta simples, particularmente útil em países com alta prevalência de toxoplasmose latente na população em geral.

Em continuidade, devido ao valor das IgG na TC/Aids, este achado nos estimulou a estudar o perfil das subclasses de IgG em amostras de soro e LCR. Adicionalmente, o valor diagnóstico das imunoglobulinas A (IgA) e E (IgE) na toxoplasmose cerebral não é bem estabelecido. Alguns autores destacam que estas imunoglobulinas podem constituir marcadores interessantes para o risco de toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos, provendo valiosa assistência no diagnóstico da toxoplasmose, especialmente quando testes para anticorpos IgM são pouco sensíveis (Pinon et al., 1995; Gross et al., 1997).

Uma vez que anticorpos IgA e IgE aparecem no início da infecção, avaliamos se estes persistem na reativação. No entanto, não detectamos níveis de IgA e IgE nos grupos de soros estudados utilizando ambos os antígenos. Em concordância com nossos achados, Borges e Figueiredo (2004b) estudando um grupo de 55 pacientes com TC/Aids, observaram que não há correlação entre a positividade de anticorpos IgA no soro e o diagnóstico da toxoplasmose cerebral. Ainda, tem sido demonstrado que anticorpos IgA podem ser detectados com alta frequência por períodos prolongados após infecção com o parasita, sugerindo que esta imunoglobulina não é um bom marcador para o diagnóstico da infecção recente por *T. gondii* (Nascimento et al., 2008). Entretanto, um aumento dos títulos de anticorpos IgA no soro em associação com a proliferação de taquizoítos no cérebro de camundongos tem sido observado (Singh et al., 2010).

Anticorpos IgE anti-*T. gondii* aparecem no início da infecção, quase que simultaneamente com anticorpos IgM e IgA, mas não são encontrados após 4 meses (Paul, 1997). Entretanto, anticorpos IgE específicos já foram detectados por ELISA em indivíduos com toxoplasmose crônica (Pinon et al., 1990). Em pacientes imunocomprometidos (transplantados ou pacientes com TC/Aids) alguns autores relatam ter encontrado anticorpos IgE anti-*T. gondii* (Pinon et al., 1990). Durante a reativação da toxoplasmose em adultos imunocomprometidos (transplantados renais) a emergência e aumento de IgE coincide com IgG, mas IgE desaparece mais rapidamente (Foudrinier et al., 2003). Desta forma, alguns autores destacam que níveis aumentados de IgE se correlaciona com início da inflamação aguda ou com a forma reativada da toxoplasmose, no entanto, um resultado negativo não exclui a possibilidade de toxoplasmose aguda (Pinon et al., 1990; Gross et al., 1997; Matowicka-Karna et al., 2009).

Como mencionamos, neste estudo não detectamos níveis de IgE e IgA nos soros de pacientes com TC/Aids, não se mostrando útil portanto para o diagnóstico diferencial da toxoplasmose cerebral na nossa casuística. Importante considerar também alguns aspectos que podem estar envolvidos,

como o tempo de infecção, a heterogeneidade e “status” imune do paciente, além da compartimentalização de anticorpos, uma vez que, algumas imunoglobulinas podem mais facilmente serem encontradas em determinados fluídos corporais como saliva e lágrima, já que a síntese local de anticorpos tem sido demonstrada, embora estes anticorpos também possam passar através de algumas barreiras celulares (Correa et al., 2007).

Em relação ao perfil de subclasses de IgG, utilizando o ALT altos níveis de IgG1 foram observados em amostras de pacientes com TC/Aids, outras neuroinfecções, Aids e soropositivos para toxoplasmose e HIV negativo e soropositivos para toxoplasmose. Nestes grupos, não foram detectados níveis de IgG2, 3 e 4. Sabe-se que IgG1 é a subclasse mais abundante no soro correspondendo a 43-75% do total de IgG, enquanto IgG2 corresponde a 16-48%, IgG3 1.7-7% e IgG4 0.8-11.7% (Meulenbroek and Zeijlemaker, 1996; Salfeld, 2007). Anticorpos IgG, especialmente IgG1, reagem com muitos antígenos totais do parasita e de excreção/secreção, o qual o peso molecular varia de 4 a >115 kDa (Fatoohi et al., 2004). A determinação sequencial de subclasses de IgG tem sido avaliada na toxoplasmose primária e reativada e IgG1 foi o isotipo predominante em diferentes estágios da infecção (Souza e Silva et al., 2012). A capacidade de IgG1 e IgG3 fixarem efetivamente o sistema complemento é importante para a resistência contra *T. gondii*, uma vez que o parasita é lisado por anticorpos na presença do complemento (Feldman, 1980). Mesmo assim, a resposta humoral é muito heterogênea entre os indivíduos e contra diferentes estágios do parasita (Correa et al., 2007).

Santana et al. (2012) mostrou a cinética de IgG1 para o antígeno recombinante SAG2A e antígeno bruto de taquizoítos, a qual foi similar em pacientes com toxoplasmose com mais de 12 meses de infecção.

Em contraste, utilizando ESA, o qual é capaz de distinguir entre a doença ativa, obtivemos um perfil distinto de subclasses comparado ao ALT. Em pacientes com TC/Aids, observamos a produção de IgG4 e alta produção de IgG2 em pacientes cronicamente infectados. Estes resultados mostram que a diferença observada com o uso da ESA como antígeno, tanto

em amostras de soro como de LCR, permite inferir um perfil de subclasses de IgG distinto entre os dois grupos. Importante notar que não houve distinção de subclasses de IgG utilizando o antígeno ALT.

Watthanakulpanich et al., (2008) empregando antígenos excretados/secretados de *Toxocara canis* (TES), mostrou uma alta resposta de IgG2. Os autores atribuíram este fato à composição do antígeno, uma vez que respostas de IgG2 são primariamente dirigidas contra antígenos carboidratos, os quais são componentes comuns do antígeno em questão.

A secreção de IgG2 é induzida por IL-2 (Interleucina 2), um importante fator de crescimento de células T e B, caracterizando o início de uma resposta mediada por células do tipo Th1, a qual confere proteção contra a infecção (Correa et al., 2007). No decorrer da atividade efetora de todos os componentes envolvidos neste tipo de resposta, a participação das células Th2 é fundamental, uma vez que estas secretam citocinas que são liberadas para limitar as conseqüências lesivas da imunidade mediada por células, suprimindo a reação inflamatória por inibirem a ativação dos macrófagos. Desta forma, a secreção de IgG2 também é aumentada pela produção de IL-6, uma citocina Th2 que funciona como fator de crescimento de linfócitos B já diferenciados e secretores de anticorpos (Correa et al., 2007). Neste contexto, nossos achados a cerca de IgG2 em amostras de soro e LCR no grupo de indivíduos crônicos (sem infecção ativa por *T. gondii*) utilizando ESA como antígeno podem ser explicados devido ao controle da infecção nestes indivíduos, com perfil misto de resposta Th1 efetora e Th2 benéfica contendo uma possível resposta Th1 exacerbada.

Em pacientes com TC/Aids, nossos achados referentes à IgG4 utilizando ESA são atribuídos à sua produção que parece ser dirigida por citocinas Th2, tais como IL-4, IL-13 e IL-10 (Correa et al., 2007; Nirula et al., 2011). Uma vez que, nestes pacientes a resposta imune celular se encontra prejudicada, um perfil de resposta Th2 que predispõe à replicação do parasita é esperada. Apesar de IgG4 refletir uma estimulação antigênica prolongada (Scott et al., 1990), o encontro de IgG4 nestes pacientes nos leva a crer que nestes, há um perfil de resposta não benéfica e que

predispõe à infecção, uma vez que IgG4 tem sua produção inibida por IFN- $\gamma$  (uma citocina Th1), não ativa complemento e tem função efetora reduzida quando comparada à outras subclasses de IgG (Nirula et al., 2011).

Quando avaliamos a resposta imune celular, verificamos que altos níveis de IFN- $\gamma$  foram produzidos em amostras de indivíduos soropositivos para toxoplasmose utilizando tanto o ALT quanto ESA. No entanto, uma produção maior e estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ), foi observada quando utilizamos o primeiro antígeno. Tal fato, atribuímos à composição do antígeno, o qual consiste na combinação de inúmeros antígenos do parasita, tanto os citoplasmáticos como os de membrana, os quais exibem múltiplos epítopos e são capazes de estimular mais as células do que a ESA. Em adição, esta grande produção de IFN- $\gamma$ , observada em indivíduos crônicos é explicável, uma vez que, se tem relatado que durante a infecção crônica, linfócitos T específicos para *T. gondii* liberam altos níveis de IFN- $\gamma$ , necessários para prevenir a reativação de cistos teciduais (Sarciron e Gherardi, 2000).

No presente estudo, pacientes com TC/Aids mediante estímulo com ambos os antígenos, apresentaram uma deficiência na produção de IFN- $\gamma$ , o que não foi observado nos pacientes com toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II). Ao compararmos esta produção deficiente à dos indivíduos soropositivos para toxoplasmose (Grupo III) e àqueles com a doença tratada (Grupo II), observamos que esta diferença foi estatisticamente menor ( $p < 0.005$ ).

Sabe-se que esta citocina é naturalmente secretada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, mas também por células Natural Killer (NK), as quais são ativadas no início da infecção. Na resistência contra *T. gondii*, IFN- $\gamma$  tem um papel chave tanto na infecção recente bem como em prevenir sua reativação (Denkers et al., 1993; Sarciron e Gherardi, 2000). O requerimento mútuo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, bem como de IFN- $\gamma$  na resistência contra o parasita em diferentes modelos animais indicam que estas populações de células T são a maior fonte desta citocina durante a infecção por *T. gondii*. Em concordância, tem sido demonstrado que a resposta a IFN- $\gamma$  e IL-2 está

ligada a porcentagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> presente na suspensão de PBMC (Gazzinelli et al., 1995).

Corroborando com nossos achados, alguns estudos demonstram que baixos níveis desta citocina estão intimamente associados à redução e/ou defeito na capacidade células T CD4<sup>+</sup> destes pacientes em produzir tal citocina, bem como IL-2, uma importante citocina que age na expansão clonal de células T (Gazzinelli et al., 1995; Sarciron e Gherardi, 2000).

Já em relação ao TNF- $\alpha$ , altos níveis desta citocina foram encontrados nas amostras de pacientes com TC/Aids em comparação com aqueles com toxoplasmose cerebral prévia tratada e indivíduos soropositivos, sendo em maior proporção quando utilizamos o ALT. TNF- $\alpha$  é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes na toxoplasmose, sendo a segunda citocina efetora que parece estar envolvida diretamente na regulação do crescimento de taquizoítos em diferentes sistemas (Gazzinelli et al., 1995). Estudos *in vitro* (Sibley et al., 1992; Langermans et al., 1992) e *in vivo* (Chang et al., 1990; Gazzinelli et al., 1993) sugerem que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  se complementam na ativação de macrófagos e na regulação do crescimento do parasita em modelo animal. Adicionalmente, a neutralização de TNF- $\alpha$  endógeno durante a toxoplasmose crônica resulta numa exacerbação letal da doença. Rezende-Oliveira et al. (2012) mostraram um perfil imunológico caracterizado por uma resposta predominantemente pró-inflamatória com altos níveis de TNF- $\alpha$  em mulheres não gestantes. Tais achados demonstram o papel crucial desta citocina no controle do parasita durante a infecção crônica.

Neste contexto, acreditamos que os altos níveis de TNF- $\alpha$  encontrados nos pacientes com TC/Aids refletem a alta resposta inflamatória que ocorre nestes pacientes. Em adição, especula-se que o crescimento do parasita nos últimos estágios de infecção por HIV que precedem a Aids é acompanhada por uma grande síntese desta citocina (Gazzinelli et al., 1995; Sarciron e Guerardi, 2000). Ao avaliar os efeitos da infecção pelo HIV na síntese de citocinas por células PBMC de pacientes assintomáticos e com Aids, alguns autores sugerem que a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 não é inibida

durante os diferentes estágios de infecção pelo HIV. Além disso, embora tais citocinas possam ser produzidas por diferentes populações celulares, os experimentos sugerem que a maior fonte destas citocinas em resposta ao antígeno bruto de *T. gondii* é o monócito, uma vez que a remoção de monócitos de PBMC de pacientes com Aids aboliu completamente sua produção em resposta à antígenos do parasita (Gazzinelli et al., 1995).

A liberação de TNF- $\alpha$  também pode ser essencial no controle da encefalite toxoplásmica em camundongos. Körner et al. (2010) mostraram que a neutralização de TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  resulta numa rápida mortalidade em camundongos infectados por *T. gondii* e bloqueia a função efetora de macrófagos contra taquizoítos.

Interessantemente, mesmo a síntese de TNF- $\alpha$  não sendo afetada durante a infecção por HIV, sua ação sem a participação de outras citocinas não é suficiente para ativar macrófagos a matar ou controlar o crescimento de taquizoítos. Uma vez que monócitos de pacientes com TC/Aids produzem altos níveis de TNF- $\alpha$  em resposta a antígenos do parasita, especula-se que a deficiência na síntese de IFN- $\gamma$  é o defeito primário 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). Estes achados vão de encontro com os obtidos neste estudo, onde também verificamos um perfil de deficiência na produção de IFN- $\gamma$  e altos níveis de TNF- $\alpha$  mediante estímulo com dois antígenos diferentes do parasita.

Em contrapartida, ao avaliarmos os níveis de IL-10, nossos resultados mostraram uma pequena produção nos pacientes com TC/Aids, níveis estatisticamente menores naqueles com toxoplasmose cerebral prévia tratada (Grupo II) e um pouco mais elevados em indivíduos soropositivos para *T. gondii*, utilizando ambos os antígenos como estímulo. No entanto, uma grande produção de IL-10 nos indivíduos soronegativos para *T. gondii* foram observadas.

Sabe-se que IL-10 é produzida por uma grande variedade de células, tais como linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th2) e T CD8<sup>+</sup>, linfócitos B, células dendríticas e

macrófagos (Tait e Hunter, 2009). Em adição, esta última população celular, parece ser o principal alvo da ação supressora da IL-10 (Moore et al., 1993). Uma vez que, IL-10 inibe a síntese de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos, esta citocina se constitui num importante modulador das funções efetoras destas células contra diferentes patógenos, inclusive *T. gondii* (Gazzinelli et al., 1992; Tait e Hunter, 2009). O principal método pelo qual IL-10 inibe a síntese de IFN- $\gamma$  por células Natural Killer (NK) e linfócitos Th1 é através da inibição da síntese de IL-12 pelos macrófagos (D'Andrea et al., 1993; Hsieh et al., 1993; Suzuki, 1999; Langermans et al., 2001).

Por outro lado, IL-10 pode exercer um papel regulatório e pode ser necessário para prevenir efeitos imunopatológicos de uma resposta imune não controlada (Sarciron e Gherardi, 2000). A indução de IL-10 pode ser uma importante estratégia pela qual os parasitas evadem da destruição pela resposta imune mediada por células dependente de IFN- $\gamma$  (Gazzinelli et al., 1992). Estudos com camundongos deficientes de IL-10 mostraram uma mortalidade aumentada durante a fase aguda da infecção, confirmando o importante papel da indução simultânea de citocinas regulatórias (Gazzinelli et al., 1996).

Além disso, especula-se que esta citocina seja associada com a proteção ou aumento da suscetibilidade à infecção, dependendo se o camundongo possui linfócitos. Neyer et al. (1997) mostrou que em camundongos com deficiência de linfócitos, IL-10 endógeno é associado ao aumento da suscetibilidade a *T. gondii*. Tal fato nos leva a crer que a produção mais elevada de IL-10 observada nos indivíduos soropositivos e soronegativos para *T. gondii* sugere um efeito imunoregulatório, uma vez que tais indivíduos não apresentam deficiência de linfócitos e níveis normais de IFN- $\gamma$ , que como já foi mencionado, é a citocina-chave para a proteção contra a infecção. Já no contexto da co-infecção TC/Aids, este balanço é diferente, pois estes pacientes apresentam uma deficiência no número de células T CD4<sup>+</sup>, o que de certa forma favorece uma suscetibilidade à infecção.

Deckert-Schluter et al. (1997) estudaram o efeito inibitório de IL-10 sobre a produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e verificaram que um aumento na secreção de IL-4 e IL-10 foi associada com a diminuição de TNF- $\alpha$  e menos significativamente com IFN- $\gamma$ . Desta maneira, sugere-se que quando há aumento nos níveis de IL-4 e IL-10, há uma diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (este em pequenas proporções). Observamos tal fato ao analisarmos nossos resultados com relação aos indivíduos soronegativos para *T. gondii* e HIV. No entanto, em pacientes com TC/Aids, esta dicotomia é diferente, uma vez que detectamos altos níveis de TNF- $\alpha$  em comparação à baixos níveis de IL-10. Corroborando com este achado, Kumar et al. (1998) mostrou uma produção reduzida de IL-10 por células T CD4+ de indivíduos HIV positivos, sugerindo que tais células possam apresentar um defeito na produção de IL-10.

Em continuidade, com o objetivo de avaliar o perfil de citocinas produzidas ou inibidas de acordo com a evolução do tratamento dos pacientes com TC/Aids, obtivemos três amostras deste grupo durante 15 dias de tratamento e comparamos estes achados com o grupo de pacientes com toxoplasmose cerebral prévia tratada a mais de 12 meses. Os resultados gerados mostram que, com a evolução do tratamento, há um pequeno aumento na produção de IFN- $\gamma$ , observado em 53% dos pacientes, porém não estatisticamente significativo ( $p > 0.05$ ). De qualquer modo, este aumento mesmo que discreto, nos leva a crer que, conforme o tratamento avança, há uma melhora no quadro clínico e imunológico do paciente, visto que esta citocina desempenha um papel fundamental no controle da infecção como já anteriormente mencionado. Em concordância, observamos que pacientes com toxoplasmose cerebral tratada, apresentaram aumento estatisticamente significativo dos níveis desta citocina quando comparadas a primeira coleta do grupo anterior ( $p < 0.05$ ).

Em contrapartida, observamos uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) dos níveis de TNF- $\alpha$  em 73% dos pacientes, bem como níveis baixos desta citocina em pacientes com toxoplasmose cerebral prévia tratada. Tal achado sugere que com a efetividade do tratamento e controle

da infecção, reduz-se a alta resposta inflamatória desencadeada por esta citocina.

Já em relação à produção de IL-10, observamos uma discreta diminuição em 67% dos pacientes e naqueles com toxoplasmose cerebral tratada, porém sem diferenças estatisticamente significantes. Como mencionamos, IL-10 tem a capacidade de inibir a síntese de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$ . Neste contexto, com a evolução do tratamento, observamos que parte dos pacientes apresentou um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e conseqüentemente uma menor produção de IL-10, o que pode sugerir seu papel regulatório e conseqüente diminuição da suscetibilidade à infecção.

Dentre os resultados encontrados, importante ressaltar aqueles obtidos mediante estímulo com o proliferador mitótico fitohemaglutinina (PHA), utilizado como controle positivo nos ensaios. A fitohemaglutinina é uma lectina de *Phaseolus vulgaris*, dotada das propriedades de ativar e induzir a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* (Machado Junior et al., 2006). Nossos resultados mostram que mesmo com este estímulo, pacientes com TC/Aids apresentaram pequena produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 em comparação com os outros grupos. Este resultado reforça a hipótese de que, nestes pacientes há um possível defeito na capacidade de células mononucleares produzirem tais citocinas que, conforme já demonstrado, pode ser devido à infecção por HIV (Kumar et al., 1998).

Por fim, os níveis de IL-12 (p70) e IL-4 também foram avaliados. No entanto, não detectamos níveis destas citocinas em nenhum dos grupos estudados. IL-12 é secretada por células dendríticas e macrófagos e estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e linfócitos T, aumenta a citotoxicidade por células NK e linfócitos T citotóxicos, além de promover a diferenciação de células Th1 (Abbas et al., 2011a). Prévios estudos têm mostrado que IFN- $\gamma$  potencializa a síntese de IL-12 por macrófagos em indivíduos crônicos por diferentes estímulos (Gazzinelli et al., 1995, Abbas et al., 2011a). Uma vez que tais indivíduos apresentam altos níveis de IFN- $\gamma$ , esperávamos encontrar níveis desta citocina neste grupo de indivíduos.

Durante a infecção pelo HIV, o aumento da suscetibilidade a *T. gondii*, além de ser devido principalmente à diminuição nos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, pode refletir uma diminuição na síntese de IL-12 (Gazzinelli et al., 1995; Maggi et al., 1994). Em adição, a síntese de IL-12 é diminuída em células mononucleares de indivíduos infectados pelo HIV, em comparação aos altos níveis de IL-12 (p40) encontrados em indivíduos HIV negativos (Gazzinelli et al., 1995).

Com relação a IL-4, esta é uma das principais citocinas produzida por células Th2 e funciona tanto como uma citocina indutora como efetora dessas células. IL-4 e IL-13 suprimem a ativação clássica dos macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  e inibe, assim, a defesa contra microrganismos intracelulares. Em nossos resultados, verificamos que pacientes com TC/Aids produziam níveis de IgG4 utilizando o antígeno ESA. Como alguns autores relatam que a produção desta subclasse de imunoglobulina é desencadeada pela ação da IL-4 (Correa et al., 2007; Nirula et al., 2011) verificamos se seria possível detectar tal citocina. No entanto, como foi dito, não detectamos seus níveis em nenhum dos grupos estudados.

Neste estudo, apesar de grande parte dos pacientes com TC/Aids compartilharem o mesmo perfil de resposta, destacamos que não obtivemos uma homogeneidade nos resultados. Acreditamos que diversos fatores devem ser considerados neste contexto, os quais podem influenciar no tipo de resposta gerada. A heterogeneidade imune de cada indivíduo, bem como a diversidade genética do parasita, tratamento, a rota de infecção e até mesmo a genética do hospedeiro são alguns deles. Sabe-se que, em humanos, genes do complexo principal de histocompatibilidade-MHC (sistema HLA), particularmente HLA-DQ, são relatados como associados ao controle genético no desenvolvimento da doença. HLA-DQ3 parece ser um marcador genético de suscetibilidade para o desenvolvimento de toxoplasmose cerebral em pacientes com Aids, ao passo que, HLA-DQ1 se constitui num marcador de resistência (Suzuki et al., 1996; Carruthers e Suzuki, 2007). Uma vez que tais genes fazem parte do MHC, estes

poderiam influenciar na regulação da resposta imune gerada pelos pacientes.

Outro aspecto importante é compartimentalização da resposta imune. Já se têm demonstrado diferenças em relação à produção de citocinas de acordo com o tipo de amostra, tais como soro, amostras de órgãos linfóides bem como PBMC. Como exemplo, na leishmaniose visceral em humanos, Goto e Prianti (2009) discutem que durante a doença ativa são detectados altos níveis de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  no soro, e elevada expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  em amostras de órgãos linfóides, sugerindo um estado intensamente ativado do sistema imunológico. Este processo de intensa ativação provavelmente ocorreria no baço e fígado, sendo confirmados com amostras de órgãos. Entretanto, utilizando PBMC, observa-se que estas respondem pobremente aos antígenos de *Leishmania*. As autoras sugerem que a explicação para esta resposta deficiente seria porque os linfócitos comprometidos com antígeno de *Leishmania* são seqüestrados nos órgãos linfóides e que neste contexto, para se entender o processo de infecção e doença, seria importante a análise de tais órgãos. Além disso, a comparação dos resultados obtidos em modelo animal nem sempre se traduz da mesma forma para o modelo humano (Goto e Prianti, 2009), pois há diversos fatores relacionados ao parasita bem como aqueles não específicos do hospedeiro que devem ser considerados.

Diante de todos estes aspectos, em pacientes TC/Aids, avaliar a importância da imunossupressão induzida pela infecção por HIV e predizer o exato papel de cada citocina em tal modelo complexo variando de um paciente HIV a outro são questionamentos importantes.

Todos estes dados gerados neste estudo, sugerem que a utilização da ESA de *T. gondii* se constitui num importante marcador sorológico no diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com Aids, seja pela detecção de anticorpos IgG total ou de suas subclasses, tanto em amostras de soro quanto de LCR. No entanto, para avaliação da resposta imune celular, o emprego do antígeno ALT foi mais satisfatório, desencadeando uma produção maior de todas as citocinas avaliadas.

Em suma, em pacientes com TC/Aids tanto ALT quanto ESA desencadearam um perfil de resposta celular caracterizado por baixos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 e altos níveis de TNF- $\alpha$ . Níveis estes que, na maioria dos pacientes mudam de acordo com o tratamento. Em adição, o perfil de resposta imune humoral nestes pacientes é caracterizado por ausência de anticorpos IgA e IgE e níveis aumentados de IgG. Neste contexto, destacamos a utilidade da ESA em diferenciar amostras de soro (Meira et al., 2008) e LCR de pacientes com TC/Aids dos assintomáticos, além de prover um perfil distinto de subclasses de IgG, com produção de IgG4 nestes pacientes e de IgG2 nos indivíduos soropositivos para toxoplasmose e assintomáticos.

## 6. CONCLUSÕES

- Foi possível padronizar com sucesso a produção de antígenos provenientes de taquizoítos cultivados em culturas de células VERO sem SFB;
- ESA foi capaz de detectar títulos mais elevados de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no LCR de pacientes TC/Aids, se constituindo num importante marcador sorológico no diagnóstico da toxoplasmose cerebral;
- Níveis de IgG4 anti-ESA em amostras de soro e LCR de pacientes TC/Aids podem ser possíveis marcadores da infecção;
- Anticorpos IgA e IgE não se correlacionam com a reativação da toxoplasmose;
- ALT e ESA desencadearam um perfil de resposta celular caracterizado por baixos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 e altos níveis de TNF- $\alpha$ , os quais mudam de acordo com o tratamento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Propriedades gerais das respostas imunes. In: Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011a. p. 1-14.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunodeficiências congênitas e adquiridas. In: Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011b. p. 458-469b.

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

Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert Rev Mol Med 2001; 6: 1-19.

Aliberti J. Host persistence: exploitation of antiinflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. Nat Rev Immunol 2005; 5: 162-170.

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

Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog 2005; 1: 17.

Alonso R, Martinez E, Laynez P, Miguelez M, Piñero JE, Valladares B. Detección mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada de

*Toxoplasma gondii* en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Med Clin 2002; 118: 294-296.

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

Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Toxoplasmosis – congenital and in immunocompromised patients: a parallel. Parasitol Today 1993; 9: 61-63.

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

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. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. HIV/AIDS 2004; 39: 1681-1691.

Ashburn D, Evans R, Chatterton JM, Joss AW, Ho-Yen DO. *Toxoplasma* dye test using cell culture derived tachyzoites. J Clin Pathol 2000; 53: 630-3.

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

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

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

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

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

Bèla SR, Silva DAO, Cunha-Júnior JP, Pirovani CP, Chaves-Borges FA, Carvalho FR, et al. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis : analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008 ; 62 : 245-254.

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

Bessièrè MH, Swierczynski B, Cassaing S et al. Role of IFN-gamma, TNF-alpha, IL4 and IL10 in the regulation of experimental *Toxoplasma gondii* infection. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44: 87S-87S.

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

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.

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

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

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

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

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

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

Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Coller S, Coombs GH, Dunn JD, Ferguson DJ, Sanderson SJ, Wastling JM, Boothroyd JC. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-

parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem 2005; 280: 34245–34258.

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

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.

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

Buddhirongawatr R, Tungsudjai S, Chaichoune K, Sangloun C, Tantawiwattananon N, Phonaknguen R, Sukthana Y. Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 2006; 3: 15–17.

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

Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH. Mucosal defenses against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. Cell Microbiol 2006; 8: 535-544.

Camargo ME. Toxoplasmosis. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001: 65-174.

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

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

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

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

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

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

Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Trop 2002; 81: 111-122.

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

Carruthers VB, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Curr Opin Microbiol 2007; 10: 83-89.

Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. Schizophrenia Bulletin 2007; 33: 745-751.

Carruthers VB, Tomley FM. Microneme proteins in apicomplexans. Subcell Biochem. 2008; 47: 33-45. Review.

Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. JAMA 1993; 10: 729-730.

Cérède O, Dubremetz JF, Soète M, Deslée D, Vial H, Bout D, Lebrun M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. J Exp Med 2005; 453-463.

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

Chao CC, Anderson WR, Hu S, Gekker G, Martella A, Peterson PK. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. Clin Immunol Parasitol 1993; 67: 178-183.

Chang HR, Grau GE, Pechere JC. Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. Immunology 1990; 69: 33.

Chatterton JM, Evans R, Ashburn D, Joss AW, Ho-Yen DO. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. J Microbiol Methods. 2002; 51, 331–335.

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

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

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

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

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

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

Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernández AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5044-5047.

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

Copeland R, Phillpotts BA. Ocular manifestations of HIV. *eMedicine* 2006; 1-46.

Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría B, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunology* 2007; 29: 651 – 660.

Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola 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.

Costa-Silva TA, Borges MM, Galhardo CS, Pereira-Chiocola VL. Immunization with excreted/secreted proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection. *Acta Trop* 2012; 124: 203-209.

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

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

Dal Pan GJ, McArthur JC. Neuroepidemiology of HIV infection. *Neurol Clin* 1996; 14: 359-382.

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante N, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon- $\gamma$  production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1041-1048.

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

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

De Amorim Garcia CA, Oréface F, De Oliveira Lira C, Bezerra Gomes A, França M, Amorim Garcia Filho CA. Socioeconomic conditions as determining factors in the prevalence of systemic and ocular toxoplasmosis in northeastern Brazil. *Ophthalmic Epidemiology* 2004; 11: 301-317.

Deckert-Schluter M, Buck C, Weiner D et al. Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma* encephalitis. *J Neuroimmunol* 1997; 76: 167-176.

Değirmenci A, Döşkaya M, Caner A, Çiçek C, Korkmaz M, Gürüz Y, Uner A. *Toxoplasma gondii* RH Ankara: Production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Exp Parasitol* 2011; 128: 1-8.

Denkers EY, Sher A, Gazzinelli RT. CD8+ T cell interaction with *Toxoplasma gondii*: implications for processing of antigen for class I-restricted recognition. *Res Immunol* 1993; 144:51.

Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 569-588.

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

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

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

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

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

Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 2004; 126: 57-72.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* – The first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 2008; 55: 467-475.

Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd Edn. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

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; 10: 1-50.

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

Evans R, Chatterton JM, Ashburn D, Joss AW, Ho-Yen DO. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1999; 18: 879–884.

Fachado A, Fonte L, Alberti E, Hadad P, Fonseca L, Machin R, Finlay C. Usefulness of the detection of *Toxoplasma gondii* antigens in AIDS patients. *Rev Inst Med Trop* 1994; 36: 525-529.

Fatoohi AF, Cozon GJ, Gonzalo P, et al. Heterogeneity in cellular and humoral immune responses against *Toxoplasma gondii* antigen in humans. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 535-541.

Feldman HA. To establish a fact. *J Infec Dis* 1980; 141: 252-529.

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

Ferreira-da-Silva Mda F, Rodrigues RM, de Andrade EF, de Carvalho L, Gross U, Lüder CG, Barbosa HS. Spontaneous stage differentiation of

mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104: 196-200.

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

Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Penalva de Oliveira AC, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. Exp Parasitol 2008; 118: 221-227.

Feustel SM, Meissner M, Liesenfeld O. *Toxoplasma gondii* and the blood-brain barrier. Virulence 2012; 3: 1-11.

Filice GA, Clabots CR, Riciputi PE, Goni-Laguardia O, Pomeroy C. Changes in cytokine levels during reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in lungs. Infec Immun 1999; 67: 2082-2089.

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

Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Gross U, Hadding U. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. Parasitol Res 1997; 83: 637-641.

Fischer HG, Bonifas U, Reichmann G. Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. J Immunol 2000; 164: 4826-4834.

Foudrinier F, Villena I, Jaussaud R, Aubert D, Chemla C, Martinot F, Pinon JM. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked

immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 1681-1686.

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

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

Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa M, Yamada Y, Wada H, et al. L-Tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: Cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. Infect Immun 2002; 70: 779-786.

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

Gaspar G, Monereo A, Barros C et al. Incidence of first episodes of HIV: opportunistic diseases and its changes over time in the period 1987-2001 in the COMESEM Cohort Study. Presented at: 14<sup>th</sup> International AIDS Conference. Barcelona, Spain, 7-12 July 2002 (Abstract ThPeC7458).

Gazzinelli R, 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, Eltoun IA, Wynn T, Sher A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF- $\alpha$  and correlates with down – regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J Immunol* 1993; 151: 3672.

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

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.

Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 219: 127-139.

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

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

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

Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2009; 51: 241-246.

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

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

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

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

Gross U, Keksel O, Dardé ML. Value of detecting immunoglobulin E antibodies for the serologic diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 247-251.

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

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

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

Hakansson S, Morisaki H, Heuser J, Sibley LD. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 3539-47.

Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 1150-1156.

Harmer C, Hassl A, Kreinecker S, Aspöck H. *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: economic and efficient mass production. *J Microbiol Methods* 1996; 27: 225-228.

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

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

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

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

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

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

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

Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J. Clin. Microb. 1997; 35: 1411-1414.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf S, O'Garra A, Murphy KM. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. Science 1993; 260: 547-549.

Hughes HP, Hudson L, Fleck DG. In vitro culture of *Toxoplasma gondii* in primary and established cell lines. Int J Parasitol 1986; 16: 317-322.

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

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

Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. Zoonoses Public Health 2010; 57: 1-7.

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

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

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

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

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

Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2007; 77: 405-410.

John B, Ricart B, Tait Wojno ED, Harris TH, Randall LM, Christian DA, et al. Analysis of behavior and trafficking of dendritic cells within the brain during toxoplasmic encephalitis. PLoS Pathog 2011; 7: e1002246.

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

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

Johnson M, Broady K, Angelici MC, Johnson A. The relationship between nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) isoform and *Toxoplasma* strain virulence in rat and human toxoplasmosis. *Microbes Infect.* 2003; 5: 797-806.

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

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

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

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

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

Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 2011; 25: 355-364.

Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, Rosenthal BML, Sibley D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a

single monomorphic chromosome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 104: 14872–14877.

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

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 A, Angel JB, Daftarian MP, Parato K, Cameron WD, Filion L, Diaz-Mitoma F. Differential production of IL-10 by T cells and monocytes of HIV-infected individuals: association of IL-10 production with CD28-mediated immune responsiveness. Clin Exp Immunol 1998; 114: 78-86.

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

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

Langermans JAM, Van der Hulst MEB, Nibbering PH, Hiemstra OS, Fransen L, Van Furth R. IFN- $\gamma$ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . J Immunol 1992; 148:568.

Langermans JÁ, Nibbering PH, Van Vuren-Van Der Hulst ME, Van Furth R. Transforming growth factor-beta suppresses interferon-gamma-induced

toxoplasmatostatic activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor- $\alpha$  production. *Parasite Immunol* 2001; 23: 169-175.

Lappin MR. Feline infectious uveitis. *J Feline Med Surg* 2010; 2: 159-163.

Lauw FN, Pajkrt D, Hack CE, Kurimoto M, Van Deventer SJH, Van der Poll T. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *J Immunol* 2000; 165: 2783.

Lee EJ, Heo YM, Choi JH, Song HO, Ryu JS, Ahn MH. Suppressed production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated macrophages after treatment with *Toxoplasma gondii* lysate. *Korean J Parasitol* 2008; 46: 145-51.

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

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

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

Levy JK, Ritchey JW, Rottman JB et al. Elevated interleukin-10-to-interleukin-12 in feline immunodeficiency virus-infected cats predicts loss of type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 1998; 178: 503-511.

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

Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. J Infect Dis 2001; 183: 1248-1253.

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

Lynch MI, Malagueño E, Lynch LF, Ferreira S, Stheling R, Oréfice F. Anti-*Toxoplasma gondii* secretory IgA in tears of patients with ocular toxoplasmosis: immunodiagnostic validation by ELISA. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 818-22.

Lopez A, Dietz VJ, Wilson M, Navin TR, Jones JL. Preventing congenital toxoplasmosis. MMWR Recommendations and Reports 2000; 49: 59-68.

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

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

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

Machado Junior JC, Florão A, Mattana FVR, Rocha FH, Santos CAM, Wellfort-Santos AM. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006; 16: 645-655.

Macrì G, Sala M, Linder A, Pettirossi N, Scarpulla M. Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. *Parasitol Res* 2009; 105: 35-40.

Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, Annunziato F, Carli MD, Piccini MP, Manetti R, Carbonari M, Pesce AM, Del Prete G, Romagnani S. Ability of HIV to promote a Th1 to Th0 shift and to replicate preferentially in Th2 and Th0 cells. *Science* 1994; 265: 244-248.

Magno RC, Lemgruber L, Vommaro RC, De Souza W, Attias M. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech* 2005; 67:45–52.

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

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

Manzardo C, Del Mar Ortega M, Sued O, Garcia F, Moreno A, Miro JM. Central nervous system opportunistic infections in developed countries in the highly active antiretroviral therapy era. *Neurovirology* 2005 ; 11 : 72-82.

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

Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanos T, De Roodt AR, Guarnera, EA, Angel SO. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the *gra4* gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004; 11: 704–710.

Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemonia H. Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 and TNF-alpha)? *Clin Developmental Immunology* 2009; 374696.

Mechain B, Garin YJ, Robert-Gangneux F, et al. Lack of utility of specific immunoglobulin G antibody avidity for serodiagnosis of reactivated toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 703-705.

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.

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

Mele A, Paterson PJ, Prentice HG, Leoni P, Kibbler CC. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation : a report of two cases and systematic review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 2002 ; 29 : 691-698.

Mentzer A, Perry M, Fitzgerald N, Barrington S, Siddiqui A, Kulasegaram R. Is it all cerebral toxoplasmosis ? Lancet 2012; 379 : 21-27.

Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. Mol Biol Cell 2002; 13: 2397–409.

Meulenbroek AJ, Zeijlemaker WP. Human IgG subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence [online]. Sanquin, laboratory for experimental and clinical immunology university of Amsterdam, the Netherlands; 1996 (<http://www.xs4all.nl/~ednieuw/IgGsubclasses/subkl.htm>).

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

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

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

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

Moore KW, O'Garra A, Malefyt RW, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. Annu Rev Immunol 1993; 11: 165-190.

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

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

Nakaar V, Ngo HM, Aaronson EP, Coppens I, Stedman TT, Joiner KA. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci 2003; 116: 2311-20.

Nam HW. GRA Proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. Korean J Parasitol 2009; 47: S29-S37.

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.

Neudeck A, Stachelhaus S, Nischik N, Striepen B, Reichmann G, Fischer H-G. Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. Microbes and Infection 2002; 4: 581-590.

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

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

Nirula A, Glaser SM, Kalled SL, Taylor FR. What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype. Current Opinion in Rheumatology 2011; 23: 119 – 124.

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

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

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

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

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.

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

Paul M. Use of the ISAGA method in detection of specific IgM, IgA, IgE antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. Wiad Parazytol 1997; 43: 39-51.

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

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

Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. Future Microbiology 2009; 4: 1363-1379.

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

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

Petersen E. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2007; 5: 285-293.

Peterson PK, Gekker G, Hu S, Chao CC. Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. J Infect Dis 1995; 171: 516-518.

Pinard JA, Leslie NS, Irvine PJ. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. Journal of Midwifery and Women's Health 2003 ; 48 : 308-316.

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

Pinon JM, Foudrinier F, Mougeot G, Marx C, Aubert D, Toupance O, Niel G, Danis M, Camerlynck P, Remy G, Frottier J, Jolly D, Bessieres MH, Richard-Lenoble D, Bonhomme A. Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays for anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and analytical study of specific IgG immunodeficient patients. J Clin Microbiol 1995; 33: 878-884.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 941-945.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: JS Remington and JO Klein (ed.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 6<sup>o</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2005. p. 947-1091.

Rezende-Oliveira K, Silva NM, Mineo JR, Rodrigues Junior V. Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturiente women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. *Placenta* 2012; 1-6 (In press).

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

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

Roiko MS, Carruthers VB. New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cell Microbiol* 2009; 1: 1444-52.

Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo BY, Maimunah A, Rahmah N. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Tropical Biomedicine*. 2010; 27: 125–130.

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

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

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

Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1369-1372.

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

Santana SS, Silva DAO, Vaz LD, Pirovani CP, Barros GB, Lemos EM, Dietze R, Mineo JR, Cunha-Junior JP. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. *Immunology Letters* 2012; 143: 193-201.

Sarciron ME, Gherardi A. Cytokines involved in toxoplasmic encephalitis. *Scand J Immunol* 2000; 52: 534-543.

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

Schlüter D, Lohler J, Deckert M, Hof H, Schwendemann G. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterization of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. *J Neuroimmunol* 1991; 31: 185-198.

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

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

Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MAA. Sensivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. Vet Parasitol 2008; 153: 359-362.

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

Sibley LD, Adams L, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers antitoxoplasmal activity of IFN- $\gamma$  primed macrophages. J Immunol 1992; 147: 2340.

Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. Science 2004; 304: 248-253.

Sinai AP. Biogenesis and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. Subcell Biochem 2008; 47: 155-164.

Singh J, Graniello C, Yanyan Ni, Payne L, Sa Q, Hester J, Shelton BJ, Suzuki Y. *Toxoplasma* IgG and IgA, but not IgM, antibody titers increase in sera of immunocompetent mice in association with proliferation of tachyzoites in the brain during the chronic stage of infection. Microbes and Infection 2010; 12: 1252-1257.

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

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

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

Souza e Silva CH, Andrade GQ, Januário JN, Carneiro ACAV, Carneiro M, Vasconcelos-Santos DV, Vitor RWA. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012; 107: 342-347.

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

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

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

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

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

Straub K, Cheng S, Sohn C, Bradley P. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidian-restricted elements. *Cell Microbiol* 2009; 11: 590-603.

Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J Immunol* 1991; 147: 3955-3959.

Suzuki Y, Wong SY, Grumet FC, Fessel J, Montoya JG, Zolopa AR, et al. Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J Infect Dis* 1996; 173: 265-268.

Suzuki Y, Rani S, Liesenfeld O, Kojima T, Lim S, Nguyen TA, et al. Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun* 1997; 65: 2339-2345.

Suzuki Y. Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology* 1999; 201: 255-271.

Suzuki Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infec Dis* 2002; 185: 58-65.

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. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1217-1258.

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

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

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

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

Vidal JE, de Oliveira AC, Fink MC et al.: AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2008; 50: 209-212.

Vidal JE, Diaz AVH, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Colombo FA, Pereira-Chiocola 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.

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.

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

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

Watthanakulpanich D, Smith HV, Hobbs G, Whalley AJ, Billington D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. *Acta Tropica* 2008; 106: 90-95.

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

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

Wilson EH, Hunter CA. The role of astrocytes in the immunopathogenesis of Toxoplasmic encephalitis. *Int J Parasitol* 2004; 34: 543-548.

Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszynski F, Hunter CA. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* 2005; 165: 63-74.

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

## 8. ANEXOS

**Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.**

|   |   |
|---|---|
|    | <p>COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE<br/>INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"<br/>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA<br/>Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP<br/>CEP: 01246-900 – TEL: 3896-1406<br/>E-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br</p> <p><b>PARECER</b></p> |
| <p>PROTOCOLO DE PESQUISA N.º 14/11<br/>PARECER N.º 133/2011 <span style="float: right;">Data: 06/6/2011</span></p>  |   |
| <p><i>Título da Pesquisa: "Antígenos excretados-secretados (ESAs) de toxoplasmose gondii: Análise da resposta imune de hospedeiros"</i></p>   |   |
| <p><i>Investigador Principal: Dr. José Ernesto Vidal Bermudez</i></p>   |   |
| <p><b>CONSIDERAÇÕES:</b> O Comitê de Ética em Pesquisa toma ciência da nova Folha de Rosto em resposta ao Parecer CEP n.º 122/2011 e Aprova o estudo e seu TCLE.</p>  |   |
| <p>(X) APROVADO<br/>( ) APROVADO COM RECOMENDAÇÕES<br/>( ) REPROVADO<br/>( ) COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.</p>                                       |   |
| <p>TEMÁTICA ESPECIAL <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO<br/>CONEP <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO<br/>SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO</p> |   |
| <p style="text-align: center;"><br/>Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio<br/>Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R</p>  |   |

**Anexo 2 - Parecer da Comissão Científica do Instituto de Infectologia  
Emílio Ribas.**



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE**  
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE  
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMILIO RIBAS  
DIVISÃO CIENTÍFICA

**PROTOCOLO DE PESQUISA** Nº 14/2011

**TÍTULO:** "ANTIGENOS EXCRETADOS-SECRETADOS (ESAs) DE TOXOPLASMOSE GONDII:  
ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE HOSPEDEIRO INFECTADOS"

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL NO IIER:** JOSÉ ERNESTO VIDAL BERMUDEZ

**PESQUISADOR PRINCIPAL:** CRISTINA DA SILVA MEIRA

**ORIENTADORA:** VERA LUCIA PEREIRA CHIOCCOLA

**COMISSÃO CIENTÍFICA**

**Parecer C.C. nº 65/11**

A Comissão Científica, em reunião realizada em 23 de maio de 2011,  
**APROVA** o protocolo de pesquisa supra mencionado, após resposta satisfatória  
aos quesitos do relator.

São Paulo, 25 de maio de 2011.

**Prof. Dr. Nilton José Fernandes Cavalcante**

**Vice - Presidente da Comissão Científica**

**Anexo 3 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.**



**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94  
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 497/2008

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Protocolo n.º 7065/2008 sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos, com o título "Antígenos excretados-secretados (ESAs) de *Toxoplasma Gondtii*: análise da resposta imune de hospedeiros infectados" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

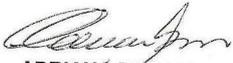
Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 15 de dezembro de 2008.

  
Prof.ª Maria Angélica B. T. Lemos  
Coordenadora do CEP/FAMERP em exercício

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - 15090-000 - São José do Rio Preto - SP - Brasil  
Tel. (17) 3201-5700 - Fax (17) 3229-1777 - [www.famerp.br](http://www.famerp.br)

**Anexo 4 - Parecer do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz.**

|   |  |   |
|---|--|---|
|    | <p><b>SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE<br/>COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS<br/>INSTITUTO ADOLFO LUTZ<br/>CTC / IAL</b></p> |  |
| <p>Projeto nº 0012D-BM10736/2008<br/><b>Antígenos excretados-secretados (ESAs) de <i>Toxoplasma gondii</i>: análise da resposta imune em hospedeiros infectados</b></p>   |  |   |
| <p>Coordenação: Vera Lúcia Pereira Chioccola</p>  |  |   |
| <p>Senhora Coordenadora,</p>  |  |   |
| <p>Comunicamos que o projeto supra citado foi <b>cadastrado</b> no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico pela CCD-BM e quanto a avaliação dos aspectos éticos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.</p> |  |   |
| <p><br/><b>ADRIANA BUGNO</b><br/>Presidente do CTC/IAL</p>  |  |   |
| <p>São Paulo, 17 de Novembro de 2008</p>  |  |   |

**Anexo 5 - Prêmio de Honra ao Mérito na Área de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública do VIII Encontro do Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD, da Secretaria de Estado da Saúde – São Paulo/SP, em 2012**



## **Anexo 6 - Carta de Informações ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

### **Nome do estudo: Antígenos excretados-secretados (ESAs) de *Toxoplasma gondii*: Análise da resposta imune de hospedeiros infectados.**

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

A suspeita diagnóstica da toxoplasmose utiliza dados clínicos e das imagens do cérebro (tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética), a qual demonstra geralmente várias lesões no cérebro. Ao redor de duas semanas depois de iniciado o tratamento para essa doença a maioria dos pacientes apresentam melhora nas suas queixas e também nas imagens do cérebro.

Estamos realizando uma pesquisa com o objetivo de estudar a resposta do organismo diante a presença do parasita em pacientes com toxoplasmose cerebral, através da avaliação de algumas proteínas produzidas por *T. gondii*. Exames de laboratório realizados com estas proteínas poderiam contribuir na identificação oportuna da doença e conhecê-la melhor.

Para que esta pesquisa seja realizada é necessária a coleta de três amostras de sangue de cada paciente internado no hospital e com diagnóstico de toxoplasmose cerebral e HIV (+)/AIDS. As amostras de sangue permitirão estabelecer a utilidade das provas que estamos avaliando. Serão necessários que 15 pacientes com toxoplasmose cerebral e HIV (+)/AIDS participem deste estudo para chegarmos às conclusões.

Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício dos parâmetros que estamos avaliando.

O objetivo deste termo é convidá-lo (você ou seu parente) a participar da pesquisa. Caso você aceite participar, será colhida 3 amostras de sangue de 15 ml por paciente, sendo uma amostra antes do tratamento, a segunda 7 dias pós tratamento e a terceira no final do tratamento específico para *T. gondii*, que servirá apenas e tão somente para o processamento dos exames que estamos estudando. Como qualquer exame de sangue, as coletas causam discreta dor durante a coleta, porém as complicações (por exemplo, hematomas ou infecções) são raras.

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

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os dados serão armazenados em um computador sem identificação, e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação. Você poderá ter acesso aos resultados dos seus exames colhidos durante o estudo, bem como terá acesso, se assim desejar, as publicações pertinentes. Este estudo foi revisado e aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa e está de acordo com a Resolução 196 e suas complementares que regulamenta a pesquisa médica em humanos.

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

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

Por favor, sinta-se a vontade para discutir qualquer aspecto referente a este protocolo com o médico pesquisador responsável por este estudo Dr. José Ernesto Vidal Bermúdez (telefone 9588-8756, email: [josevibe@gmail.com](mailto:josevibe@gmail.com)). Adicionalmente, você poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas através do telefone 3896-1406.

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

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

**Nome:** \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**Nome do investigador :** \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**Se o paciente não puder assinar:**

Nome do representante: \_\_\_\_\_

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**Anexo 7** – Meira CS, Vidal JE, Costa-Silva TA, Frazzatti-Gallina N. Pereira-Chiocola VL. Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV-infected patients using *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Diag Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 279-285.

**Anexo 8** – Costa-Silva TA, Meira CS, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in sérum free médium. Exp Parasitol 2012; 130: 463-469.

**Anexo 9** – Meira CS, Vidal JE, Costa-Silva TA, Motoie G, Gava R, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients: Profile of humoral immune response and potential diagnostic use of IgG4 levels in sérum and/or cerebrospinal fluid. Em submissão no periódico J Immun Methods.