



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

HELOISA RIBEIRO STORCHILO

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA O
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA E CONGÊNITA**

**Goiânia
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☐ Dissertação ☒ Tese

2. Nome completo do autor

HELOISA RIBEIRO STORCHILLO

3. Título do trabalho

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA E CONGÊNITA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria De Castro, Professor do Magistério Superior**, em 09/12/2020, às 19:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

16/12/2020

SEI/UFG - 1732188 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



Documento assinado eletronicamente por **HELOISA RIBEIRO STORCHILO, Discente**, em 11/12/2020, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1732188** e o código CRC **EC83CA5D**.

Referência: Processo nº 23070.052298/2020-67

SEI nº 1732188

https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1871187&infra_sistema=10000... 2/2

HELOISA RIBEIRO STORCHILO

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA O
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA E CONGÊNITA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Ana Maria de Castro

**Goiânia
2020**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro Storchilo, Heloisa

Identificação de biomarcadores para o diagnóstico da toxoplasmose aguda e congênita [manuscrito] / Heloisa Ribeiro Storchilo. - 2020.
xv, 92 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria de Castro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Immunoblotting. 2. Prognóstico. 3. Toxoplasmose aguda . 4. Toxoplasmose congênita. I. de Castro, Ana Maria, orient. II. Título.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE HELOISA RIBEIRO STORCHILO - Aos vinte e sete dias do mês de novembro do ano de 2020 (27/11/2020), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **ANA MARIA DE CASTRO** (IPTSP/UFG) (orientadora), **CLAYTON LUIZ BORGES** (ICB/UFG), **DANIELLA DE SOUSA MENDES MOREIRA ALVES** (IPTSP/UFG), **HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE** (UFJ) e **JULIANO DOMIRACI PACCEZ** (ICB/UFG) para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA E CONGÊNITA”** em nível de DOUTORADO, área de concentração em: **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PARASITOLOGIA**, de autoria de **HELOISA RIBEIRO STORCHILO** - discente do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. **ANA MARIA DE CASTRO**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da tese que, em 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1481/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata Aprovada ou Reprovada:

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Profa. Dra. Ana Maria de Castro	Aprovada
Prof. Dr. Clayton Luiz Borges	Aprovada
Profa. Dra. Daniella de Sousa Mendes Moreira Alves	Aprovada
Prof. Dr. Hanstter Hallison Alves Rezende	Aprovada
Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez	Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **habilitada**, (**Habilitada** ou não **Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTORA EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18h 15 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria De Castro, Professor do Magistério Superior**, em 01/12/2020, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hânstter Hállison Alves Rezende, Professor do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliano Domiraci Paccez, Usuário Externo**, em 04/12/2020, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clayton Luiz Borges, Professor do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella de Sousa Mendes Moreira Alves, Usuário Externo**, em 04/12/2020, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1685166** e o código CRC **6A576EAB**.

Referência: Processo nº 23070.052298/2020-67

SEI nº 1685166

*Dedico este trabalho a todas as pessoas
que enfrentam as consequências clínicas da toxoplasmose.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, especialmente aos meus pais, Anete Ribeiro Storchilo e Pietro Storchilo, que sempre me apoiaram, me motivaram e entenderam a minha ausência em momentos tão importantes em virtude dos meus estudos e futuro. E a minha irmã Clívia Ribeiro Storchilo que sempre me deu forças nos momentos mais difíceis. Obrigada por todo amor e compreensão.

Agradeço à minha orientadora Ana Maria de Castro que me acolheu com carinho por tantos anos. Obrigada pela dedicação, pelo incentivo e pelos inúmeros ensinamentos. A senhora é inspiração para a minha vida profissional e pessoal. A todos os professores (Marina Clare Vinaud, José Clecildo Barreto Bezerra e Joana D’Arc) e amigos do Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro, principalmente Taynara Cristina Gomes, Giulianne Monteiro Teixeira, Hanstter Hallison Alves Rezende, Guaraciara de Andrade Picanço, Carlos Henrique de Sousa Guerra, Nayana Ferreira de Lima, Jaqueline Ataíde, Jéssica Yonara, Daniela Braz e Daniella Alves, obrigada pelo apoio, amizade e por deixar todos os meus dias mais alegres.

Ao professor Clayton Luiz Borges agradeço por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular e ao André Luís Elias Moreira pelo auxílio nos experimentos.

Agradeço aos meus amigos de graduação (Aretha Freitas, Ana Cláudia Freitas, Fernanda Queiroz, Ana Cláudia Gomes e Luanna Afonso) que sempre cuidaram de mim e me apoiaram principalmente nos momentos mais difíceis do doutorado. Ao meu namorado Carlos Gilberto Moreira Junior pelo estímulo e carinho.

Meu agradecimento a todos os professores e funcionários do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

SUMÁRIO

QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais da toxoplasmose	1
1.1. Biomarcadores.....	1
1.3. <i>Toxoplasma gondii</i> : histórico e classificação	2
1.4. Morfologia de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
1.5. Mecanismos de transmissão	8
1.6. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
1.7. Epidemiologia da toxoplasmose.....	12
1.8. Toxoplasmose adquirida.....	13
1.9. Toxoplasmose congênita	14
1.10. Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	17
1.11. Resposta imune na toxoplasmose	18
1.12. Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
1.12.1. Antígenos de superfície	26
1.12.2. Antígenos excretados/secretados	27
1.13. Diagnóstico da toxoplasmose	26
1.13.1. Diagnóstico clínico.....	26
1.13.2. Diagnóstico laboratorial	27
1.13.2.1 Diagnóstico parasitológico.....	27
1.13.2.2 Diagnóstico sorológico.....	28
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. MÉTODOS	34
4.1. Fluxograma.....	34
4.2. Obtenção de amostras biológicas	35

4.3.	Exames laboratoriais para o diagnóstico da toxoplasmose	35
4.3.1.	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	35
4.3.2.	Extração de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i>	36
4.3.3.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
4.4.	Análise de prontuários	37
4.5.	Crítérios para seleção de amostras biológicas	37
4.6.	Obtenção e preparação de antígenos brutos de <i>Toxoplasma gondii</i>	38
4.7.	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferência	39
4.8.	Immunoblotting	40
4.9.	Determinação do perfil antigênico	40
4.10.	Análise estatística.....	40
5.	RESULTADOS	42
5.1.	Artigo - Identification of biomarkers for diagnosis and prognosis of congenital and acute toxoplasmosis.....	42
5.2.	Artigos publicados.....	43
6.	CONCLUSÕES	45
7.	PERSPECTIVAS	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXOS.....	77
	Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	77
	Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	83
	Anexo 3 – Comprovante de publicação do artigo.....	86
	Anexo 4 – Artigos publicados durante o período de execução do doutorado	87

QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1: Taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figura 2: Esquema da morfologia do taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figura 3: Esquema da morfologia do bradizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 4: Cisto tecidual de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Figura 5: Esquema do oocisto esporulado de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Figura 6: Oocisto de <i>Toxoplasma gondii</i>	8
Figura 7: Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
Tabela 1: Prevalência sorológica em gestantes cronicamente infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i> em alguns países do mundo.	16
Tabela 2: Prevalência sorológica em gestantes cronicamente infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i> nas regiões do Brasil.....	17
Figura 8: Níveis de imunoglobulinas após a infecção primária por <i>Toxoplasma gondii</i>	21
Figura 9: Esquema dos processos de adesão e invasão de <i>Toxoplasma gondii</i> à célula hospedeira.....	23
Anexos	
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética.....	77
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	83
Anexo 3: Comprovante de publicação do artigo	86
Anexo 4: Artigos publicados durante o período de execução do doutorado	87

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

AMA1: Apical Membrane Antigen 1

BSR4: Bradyzoite Surface Antigen

CMV: Citomegalovírus

DAB: 3,3' Diaminobenzidina Tetrahydrocloro

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DTT: Ditionitrito

EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

ESAs: Excreted/secreted antigens (Antígenos excretados/secretados)

EUA: Estados Unidos da América

GRA: Dense Granules Proteins (Proteínas de Grânulos Densos)

GTA: Grupo Toxoplasmose Adquirida

GTC: Grupo Toxoplasmose Congênita

HC: Hospital das Clínicas

HSPGs: Heparan Sulfate Proteoglycans (Proteoglicanos de Sulfato de Heparina)

IC: Intervalo de Confiança

IgA: Imunoglobulina A

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IFI: Imunofluorescência Indireta

IFN- γ : Interferon-gama

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico-sintase induzida

IPG: Immobilized pH Gradient (Tiras Gradientes de pH Imobilizadas)

ISAGA: Immunosorbent Agglutination Assay (Reação de Aglutinação por Imunoabsorção)

kDa: Kilodalton

LAERPH: Laboratório de Estudos da Relação Parasito Hospedeiro

LAMP: Loop-mediated Isothermal Amplification (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop)

LI: Limite Inferior

LS: Limite Superior

M: Marcador de Peso Molecular

MA: Maranhão

MICs: Microneme Proteins (Proteínas do Micronema)

mM: Milimol

NK: Natural Killer

OD: Odds Ratio

PBS: Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato-salino)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação da Cadeia da Polimerase)

pH: Potencial Hidrogeniônico

PLP1: Perforin-like Protein 1

ROM1: Rhomboid-like Protease 1

RONs: Rhoptry Neck Proteins (Proteínas de Pescoço de Roptria)

ROPs: Rhoptry Organelle Proteins (Proteínas de Roptria)

Rpm: Rotação por minuto

SAGs: Surface antigen (Antígenos de superfície)

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
(Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio)

SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SPATR: Thrombospondin Repeat

STAT-1: Signal Transducer And Activator Of Transcription 1 (Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1)

STAA: Subgrupo Toxoplasmose Adquirida Aguda

STAC: Subgrupo Toxoplasmose Adquirida Crônica

STCA: Subgrupo Toxoplasmose Congênita Assintomática

STCS: Subgrupo Toxoplasmose Congênita Sintomática

SUB1: Subtilisin-like Protein 1

SUS: Sistema Único de Saúde

TBS: Tris-buffered Saline (Salina Tris Tamponada)

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLN4: Toxolysin 4

TLRs: Receptores Toll-like

TO: Tocantins

TPI: Triosephosphate Isomerase (Triosefosfato Isomerase)

UFG: Universidade Federal de Goiás

RESUMO

Identificação de biomarcadores para o diagnóstico da toxoplasmose aguda e congênita

Introdução: O diagnóstico da toxoplasmose congênita é complexo e pode levar meses para ser confirmado, visto que a maioria dos recém-nascidos não apresenta sintomatologia e níveis detectáveis de anticorpos IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii*. Além disso, gestantes podem apresentar IgM residual, dificultando o diagnóstico da infecção aguda durante a gestão. Apesar dos diversos testes sorológicos desenvolvidos, há escassez na literatura sobre biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita e aguda. **Objetivo:** Analisar o perfil de imunoreatividade das proteínas de *T. gondii* com potencial para serem biomarcadores para o diagnóstico da toxoplasmose aguda e para o diagnóstico e prognóstico da toxoplasmose congênita. **Métodos:** Foram selecionadas amostras de soro de crianças com toxoplasmose congênita sintomática e assintomática e de mulheres em idade fértil e/ou gestantes com toxoplasmose adquirida aguda e crônica. Estas amostras foram agrupadas de acordo com os resultados laboratoriais e clínicos dos pacientes. Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para separação das proteínas de *T. gondii*. A técnica de Immunoblotting foi aplicada para a análise do perfil de proteínas imunorreativas à anticorpos IgG anti-*T.gondii*, utilizando membranas de nitrocelulose sensibilizadas com proteínas do parasito. **Resultados:** Foram analisadas 116 amostras de soro. Na comparação do perfil de proteínas imunorreativas a anticorpos presentes nas amostras dos diferentes grupos e subgrupos, as proteínas de 150, 18.5 e 16.96 kDa foram prevalentemente reconhecidas pelas amostras do grupo de infecção adquirida. As proteínas de 343, 189, 150, 75 e 42 kDa apresentaram maiores chances de ser detectadas pelo subgrupo de infecção congênita sintomática, enquanto as proteínas de 61, 50 e 16.96 kDa foram reconhecidas significativamente pelo subgrupo de infecção adquirida aguda. **Conclusões:** Diante dos resultados obtidos foi possível identificar potenciais biomarcadores que poderão auxiliar no diagnóstico e tratamento precoce da toxoplasmose, evitando o aparecimento de manifestações clínicas no decorrer da vida de crianças congenitamente infectadas.

Palavras-chaves: Immunoblotting, Prognóstico, Toxoplasmose aguda e Toxoplasmose congênita.

ABSTRACT

Identification of biomarkers for the diagnosis of acute and congenital toxoplasmosis

Introduction: The diagnosis of congenital toxoplasmosis is complex and might take months to confirm since most newborns do not present symptoms and levels of undetected IgM and IgA anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. Besides, pregnant women may have residual IgM, making it difficult to diagnose acute infection during pregnancy. Despite the various serological tests developed, there are few studies about biomarkers that can assist in the diagnosis of acute and congenital toxoplasmosis.

Objective: Analyze the immunoreactivity profile of *T. gondii* protein with the potential to be biomarkers for the diagnosis of acute toxoplasmosis and the diagnosis and prognosis of congenital toxoplasmosis. **Methods:** Serum samples were selected from children with symptomatic and asymptomatic congenital toxoplasmosis and women of childbearing age or pregnant women with acute and chronic acquired toxoplasmosis. These samples were grouped according to the patients' laboratory and clinical results. Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) was used to separate *T. gondii* proteins. The Immunoblotting technique was applied to the analysis of immunoreactive bands profile by IgG antibodies, using nitrocellulose membranes sensitized with parasite proteins. **Results:** One hundred and sixteen samples were analyzed. When comparing immunoreactive bands profile for antibodies present in samples from different groups and subgroups, the 150, 18.5, and 16.96 kDa proteins were more immunoreactive by the antibodies present in serum samples from the acquired infection group. The 343, 189, 150, 75, and 42 kDa proteins showed more chance to be detected by the symptomatic congenital infection subgroup, while the 61, 50, and 16.96 kDa proteins were significantly immunoreactive by the acute infection subgroup. **Conclusions:** Before obtained results, it was possible to identify potential biomarkers that may assist in early diagnosis and treatment of toxoplasmosis, avoiding the appearance of clinical manifestations throughout the life of children congenitally infected.

Keywords: Immunoblotting, Prognosis, Acute Toxoplasmosis and Congenital Toxoplasmosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasito intracelular obrigatório denominado *Toxoplasma gondii*, o qual apresenta capacidade de infectar uma elevada variedade de espécies animais, incluindo o homem. Devido a esta característica e de outros fatores relacionados aos mecanismos de transmissão, variedade de cepas, resistência ao ambiente em condições adversas e também pela ausência de tratamento eficaz, estima-se que um terço da população mundial esteja infectada (HALONEN; WEISS, 2013).

A maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados são assintomáticos e retrata um curso clínico benigno, entretanto a toxoplasmose apresenta como grupo de risco os indivíduos imunocomprometidos, que incluem, por exemplo, gestantes, idosos e indivíduos que vivem com HIV/SIDA (HILL; DUBEY, 2002).

A toxoplasmose é uma das infecções mais importantes quando adquirida durante o período gestacional, pois o protozoário pode infectar o feto e causar manifestações clínicas em qualquer fase da vida do indivíduo, constituindo um problema de saúde pública. Além disso, o diagnóstico da toxoplasmose congênita, em muitos casos, torna-se complexo e tardio, pois a maioria dos recém-nascidos não apresenta sintomatologia e anticorpos IgM e IgA anti-*T. gondii* (marcadores de infecção aguda) ao nascer (MAENZ *et al.*, 2014; SENSINI, 2006).

Antígenos recombinantes de *T. gondii* têm sido relatados na literatura como alternativa de aumentar a sensibilidade e especificidade de técnicas sorológicas (GRZYBOWSKI *et al.*, 2015; KHANALIHA *et al.*, 2014). No entanto, ainda não está esclarecido o uso de antígenos como biomarcadores para o diagnóstico da toxoplasmose aguda, assim como para o diagnóstico e prognóstico da toxoplasmose congênita.

1.2. Biomarcadores

De acordo com Grupo de Trabalho de Definições de Biomarcadores do Instituto Nacional da Saúde, biomarcadores apresentam uma característica objetivamente mensurável e avaliada como indicador de um processo fisiológico, patológico ou uma resposta do organismo a uma intervenção terapêutica (ATKINSON *et al.*, 2001).

Segundo Oyama (2013), biomarcadores devem fornecer informações que sejam capazes de auxiliar no estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e respostas ao tratamento instituído ao paciente, questões essas que não seriam prontamente respondidas utilizando testes convencionais.

Biomarcadores têm sido alvo de pesquisas em diferentes vertentes, mas ainda são escassas as pesquisas voltadas para o diagnóstico e prognóstico da toxoplasmose congênita. Um estudo realizado por Araújo *et al.*, (2020), demonstraram que recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentaram elevados níveis séricos de CXCL9 e de células T CD4⁺ CD25⁺ e células T IFN- γ ⁺ CD4⁺ específicas de *T. gondii*, quando comparado ao grupo controle. Nesse sentido, torna-se relevante propor abordagens diagnósticas complementares que contribuam para um manejo clínico preciso e estabelecimento efetivo de intervenção terapêutica imediatamente após o nascimento.

1.3. *Toxoplasma gondii*: histórico e classificação

T. gondii foi identificado em 1908 por Splendore em um coelho (*Oryctologus cuniculus*) em São Paulo, Brasil e no mesmo ano Nicolle e Manceaux descreveram o parasito durante uma pesquisa sobre leishmanioses em um roedor, *Ctenodactylus gondii*, no Instituto Pasteur em Tunes (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908)

Nos anos seguintes, *T. gondii* foi relatado em várias espécies animais, incluindo humanos. Em 1923, Janku relatou um caso clínico sobre uma criança de 11 meses, filho de um motorista de carruagem, que foi internada na Clínica Infantil Professor Pesina sofrendo de hidrocefalia. Após a análise da descrição clínica e os resultados da autópsia foi confirmado o diagnóstico de toxoplasmose congênita grave (JANKU, 1923).

O primeiro estudo científico detalhado foi realizado em 1937, que descreveu as formas de infecção em animais de laboratório, a virulência dos isolados e a resposta imune desenvolvida por exposição ao parasito (SABIN; OLITSKY, 1937).

Em 1939, Sabin isolou *T. gondii* de uma criança de seis anos identificada como RH, que apresentava queixas de encefalite. Após 30 dias do aparecimento das manifestações clínicas, a criança faleceu e foi realizada a inoculação de tecido nervoso em cobais, os quais apresentaram um quadro fatal. Esta cepa de laboratório,

denominada RH, tornou-se a cepa prototípica do Tipo I e desde 1938 tem sido mantida em laboratórios de pesquisa em todo o mundo (SABIN, 1941).

O nome *Toxoplasma* (toxon = arco, plasma = forma) refere-se à forma morfológica de meia lua do taquizoíto (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). Este parasito pertence ao filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (RAVDIN, 1995). Os integrantes do filo Apicomplexa são caracterizados por uma estrutura chamada complexo apical com papel importante na invasão celular (BLADER *et al.*, 2015).

1.4. Morfologia de *Toxoplasma gondii*

T. gondii apresenta morfologia diferenciada, dependendo do habitat e do estágio evolutivo. Todas as formas de desenvolvimento do parasito são infectantes e serão descritas a seguir:

Taquizoíto: É uma célula alongada, apresenta uma extremidade pontiaguda anterior (conoidal) e uma extremidade posterior arredondada. Mede aproximadamente 2 - 4 μm de largura e 4 - 8 μm de comprimento (Figura 1) (DUBEY *et al.*, 1998). Contém várias organelas e corpúsculos de inclusão, incluindo uma película constituída por três membranas onde são encontradas as proteínas de superfície: uma membrana externa (membrana plasmática ou plasmalema) e duas membranas que formam o complexo de membrana interna (membrana intermediária e interna) (BLADER *et al.*, 2015), como demonstrado na Figura 2.

O citoesqueleto é composto pelo complexo membrana interna, microtúbulos subpeliculares, anéis apicais, anéis polares e conoide que auxiliam na penetração à célula hospedeira. Esta forma evolutiva possui dois anéis apicais e dois anéis polares (externos e internos). Os anéis apicais localizam-se na extremidade anterior do parasito, enquanto o anel externo circunda a extremidade do conoide em repouso. Os anéis polares externos são um espessamento do complexo da membrana interna presentes na extremidade anterior do taquizoíto e os anéis polares internos ancoram os microtúbulos subpeliculares (DUBEY *et al.*, 1998).

O conoide é um cone oco truncado constituído por estruturas de tubulina com forma de molas. Microtúbulos são constituídos por alfa e betatubulinas e originam-se do anel polar interno percorrendo longitudinalmente quase todo o comprimento da célula (DUBEY *et al.*, 1998).

Microporos secretores consistem em estruturas denominadas roptrias, micronemas e grânulos densos, os quais liberam antígenos excretados/secretados (ESAs) que contribuem na penetração ativa à célula hospedeira. As roptrias estão localizadas entre a extremidade anterior e o núcleo. Essa organela consiste em uma porção estreita de até 2,5 µm de comprimento e uma extremidade posterior em forma de saco. Micronemas são estruturas semelhantes a bastonetes localizados na extremidade anterior do parasito e os grânulos densos encontram-se espalhados por todo o taquizoíto, principalmente na extremidade posterior (BLADER *et al.*, 2015).

Além disso, *T. gondii* possui uma mitocôndria com ramificações e presença de cristas bulbosas. O núcleo do protozoário está localizado na região central tendendo à região posterior e consiste de um envelope nuclear com poros, aglomerados de cromatina e um ou dois nucléolos localizados ao centro (DUBEY *et al.*, 1998).

O complexo de Golgi está situado na região anterior perinuclear do taquizoíto e está relacionado com o processamento dos produtos secretados pelo parasito durante a invasão à célula hospedeira. O retículo endoplasmático é predominantemente do tipo rugoso, localizado na porção posterior do corpo e lateralmente ao núcleo (DUBEY *et al.*, 1998).

Este protozoário possui três classes de ácido desoxirribonucleico (DNA nuclear, DNA mitocondrial e apicoplasto - DNA circular) e ribossomos livres uniformemente distribuídos por todo o citoplasma. A reserva de polissacarídeos em *T. gondii* é encontrada em grânulos de amilopectina que são escassos ou ausentes em taquizoítos (DUBEY *et al.*, 1998).

O taquizoíto é a forma evolutiva caracterizada pela rápida multiplicação, denominada endodiogenia, que causa rompimento das células infectadas e gera resposta imune, responsável pela formação de cistos nos tecidos dos hospedeiros (BLADER *et al.*, 2015; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

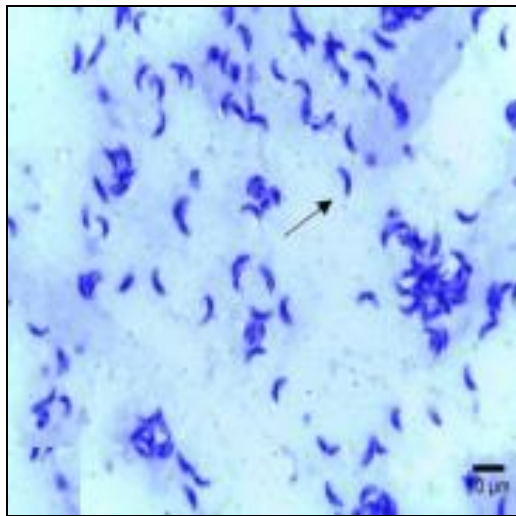


Figura 1: Taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. Taquizoíto (seta) obtidos de lavado peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c, corados por Panótico®, em aumento de 1000x. Fonte: REZENDE (2018).

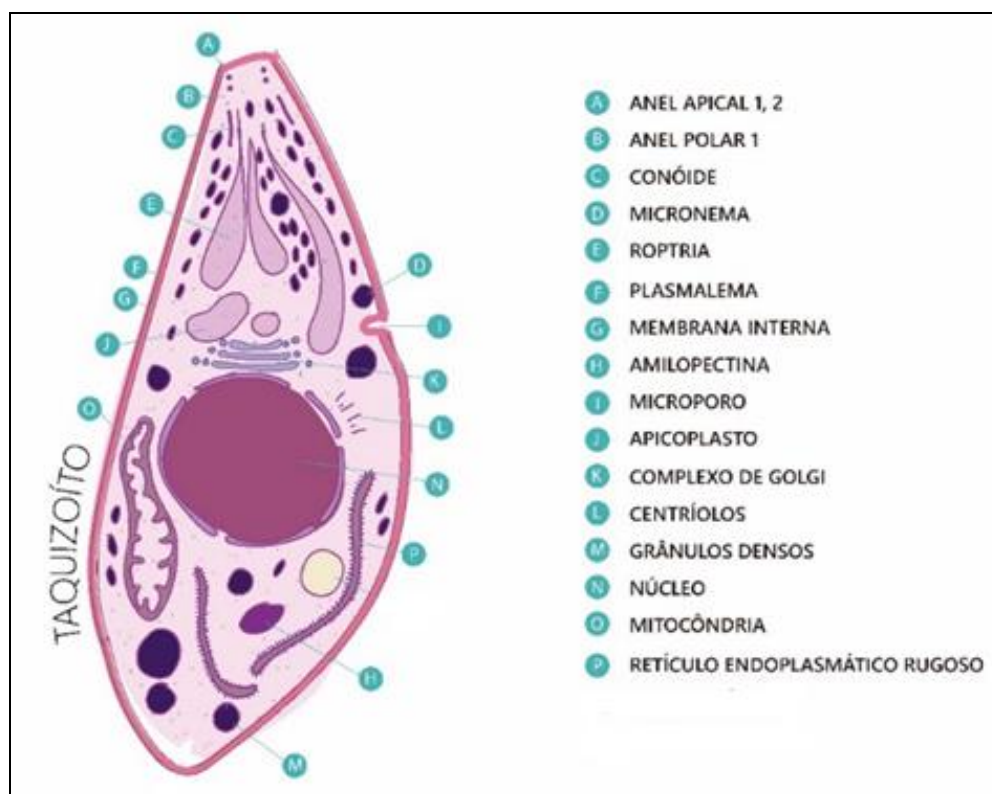


Figura 2: Esquema da morfologia do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. Fonte: TEIXEIRA (2019).

Bradizoíto: Possui características morfológicas semelhantes às do taquizoíto diferindo quanto à localização do núcleo (terminais em bradizoítos) e aos grânulos de amilopectina, os quais são numerosos nesta forma evolutiva (DUBEY *et al.*, 1998), como demonstrado na Figura 3.

O bradizoíto é encontrado dentro do cisto tecidual, o qual é formado pela membrana do vacúolo parasitóforo da célula infectada. A espessura da parede e o tamanho do cisto podem variar em função da célula hospedeira parasitada e o número de bradizoíto no seu interior, podendo atingir até 200 µm de diâmetro (Figura 4). O cisto tecidual apresenta parede resistente e elástica, isolando os bradizoíto da ação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro (DUBEY *et al.*, 1998).

Essa forma infectante multiplica-se lentamente por endodiogenia e endopoligenia no interior do cisto, o qual pode ser encontrado predominantemente no sistema nervoso central, nos olhos e nos tecidos musculares esquelético e cardíaco. Cistos contendo bradizoíto viáveis persistem por anos e provavelmente pelo resto da vida do hospedeiro, muitas vezes sem causar resposta inflamatória (FRENKEL, 1988).

A parede cística pode ocasionalmente romper e liberar bradizoíto que se diferenciam em taquizoíto, invadem novas células, ocorrendo multiplicação e disseminação que podem causar graves sequelas e até mesmo o óbito de pessoas imunocomprometidas (SKARIAH *et al.*, 2010).

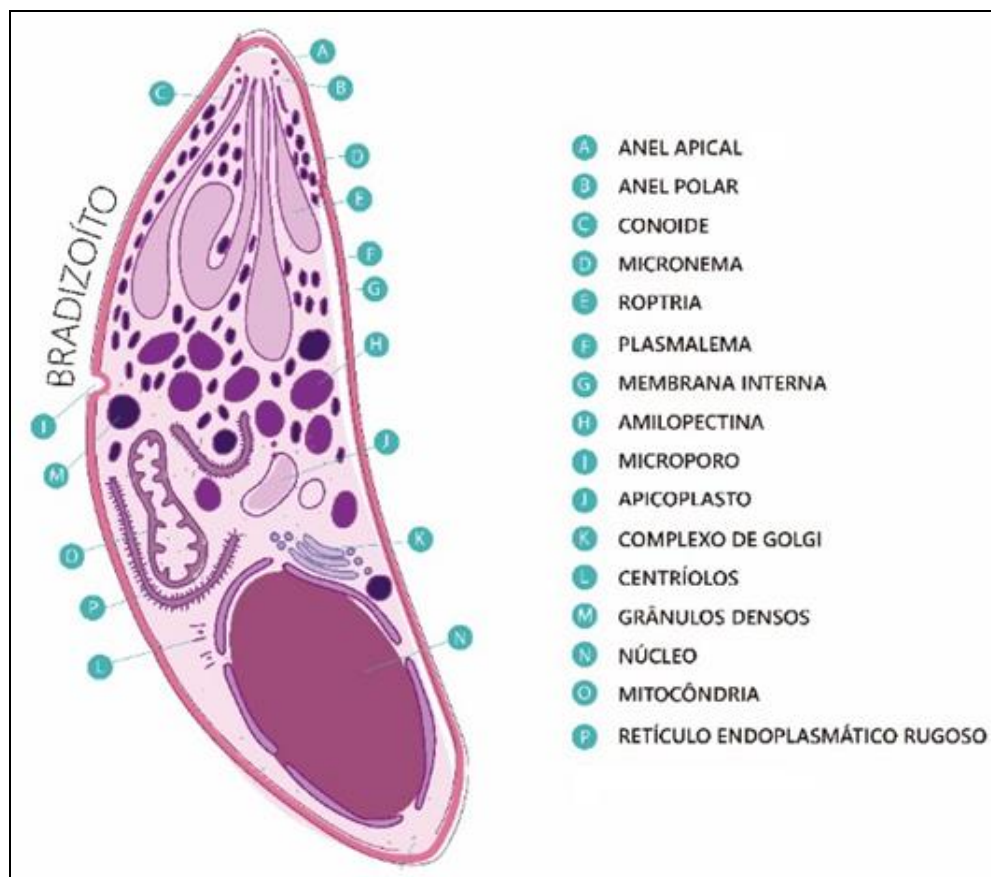


Figura 3: Esquema da morfologia do bradizoíto de *Toxoplasma gondii*. Fonte: TEIXEIRA (2019).

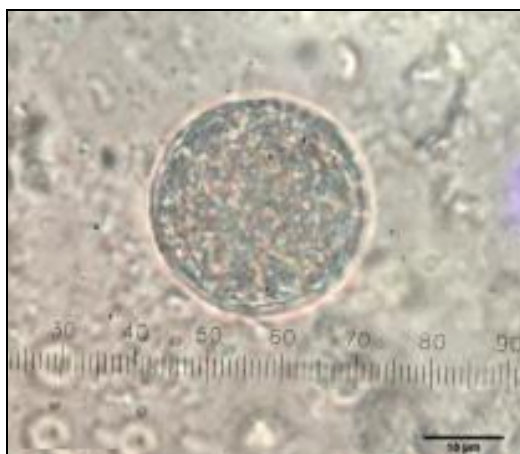


Figura 4: Cisto tecidual de *Toxoplasma gondii*. Cisto cerebral de um camundongo infectado com *T. gondii*, cepa cistogênica ME-49, a fresco entre lâmina e lamínula, ampliação de 400x. Fonte: REZENDE (2018).

Esporozoíto: é a forma infectante presente no oocisto que é esférico, mede cerca de 11 x 12,5 µm e após ser eliminado pelas fezes dos felídeos sofre esporulação no meio ambiente formando dois esporocistos (6 x 8 µm), com quatro esporozoítos (2 x 6 µm) cada (Figura 5 e 6) (BLADER *et al.*, 2015; SPEER *et al.*, 1998).

A parede do oocisto possui dupla camada, sendo que a camada externa é composta por mais de 90% de proteínas, das quais várias são estruturas ricas em cisteína e tirosina (POSSENTI *et al.*, 2010). Devido a esta característica, o oocisto permanece viável no meio ambiente por até 18 meses em condições de temperatura e umidade favoráveis, sendo resistente também a desinfetantes, raio ultravioleta, ozônio e produtos à base de cloro (BELLI *et al.*, 2006; JONES; DUBEY, 2010). Entretanto, os oocistos são inativados após exposição a temperaturas acima de 60°C por dez minutos (DUBEY, 1998).

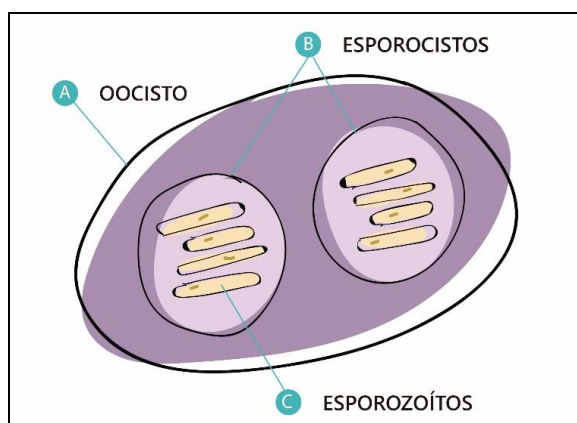


Figura 5: Esquema do oocisto esporulado de *Toxoplasma gondi*. Fonte: TEIXEIRA (2019).

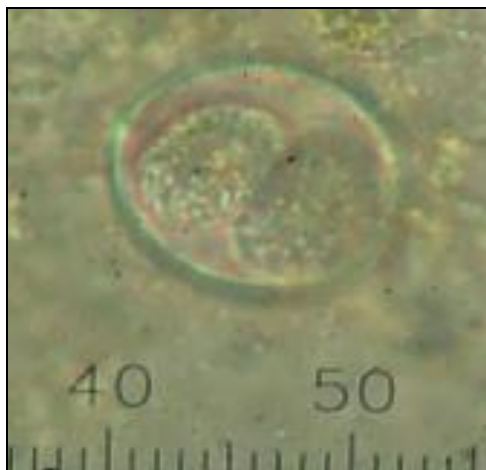


Figura 6: Oocisto de *Toxoplasma gondii*. Oocisto esporulado em fezes a fresco, ampliação de 1000x, escala de 10µm. Fonte: REZENDE (2018).

1.5. Mecanismos de transmissão

Como citado, todas as formas evolutivas são infectantes e estão diretamente relacionadas aos mecanismos de transmissão que podem ser agrupadas em três vias principais: ingestão de cistos teciduais, ingestão de oocistos e transmissão congênita.

1. A forma mais comum de infecção por *T. gondii* é pela ingestão de cistos encontrados em carne crua ou mal cozida principalmente devido aos hábitos alimentares de populações (SILVA *et al.*, 2014).

Estudos realizados nos Estados Unidos demonstraram que um número considerável de novas infecções por este parasito está associado ao consumo de carne suína (GUO *et al.*, 2017) e que os riscos de exposição de carnes de aves, porcos, cabras e cordeiros criados livres são mais altos do que aqueles criados em confinamento (GUO *et al.*, 2015). No entanto, outros estudos demonstram a importância da carne bovina como fonte de infecção para o homem, visto que a prevalência de *T. gondii* em bovinos é de 2,6% em todo o mundo (BELLUCO *et al.*, 2016). Na Holanda, estima-se que o consumo de carne bovina contribui para 68% das infecções previstas (OPSTEEGH *et al.*, 2011) e na Itália, um estudo apresentou uma probabilidade anual de infecção de 0,019% para carne suína e 0,034% para carne bovina, este último, resultando em 15.151 novos casos de toxoplasmose em humanos (BELLUCO *et al.*, 2018).

2. Em segundo lugar, ingestão de oocistos que pode ocorrer pela falta de higienização das mãos após contato com solo contaminado com oocistos esporulados ou

caixas de areia e pela lavagem inadequada dos alimentos, principalmente os que são consumidos crus, como vegetais e frutas (HILL; DUBEY, 2016).

A presença de oocistos na água é uma importante fonte de infecção em países emergentes e subdesenvolvidos, onde a água pode ser consumida sem qualquer tratamento (VIEIRA *et al.*, 2015). Há relatos de contaminação de água potável causando surtos em municípios, como o de Santa Isabel do Ivaí, Paraná, Brasil, onde mais de 400 moradores apresentaram toxoplasmose aguda após o consumo de água contaminada dos reservatórios da cidade (ALMEIDA *et al.*, 2011)

Evidências sugerem que a infecção causada pela ingestão de oocistos é clinicamente mais grave do que a infecção adquirida por cistos teciduais, devido à suscetibilidade do homem (DUBEY, 2010). Em um estudo realizado nos Estados Unidos, a toxoplasmose foi identificada como uma das principais causas de mortes e de hospitalizações relacionadas a doenças transmitidas por alimentos (SCALLAN *et al.*, 2011). Além disso, há evidências de que crustáceos em ambientes marítimos contaminados também podem representar uma fonte viável de infecção (GUY, 2017; HADFIELD; KRUSOR *et al.*, 2015).

3. A transmissão congênita é a terceira via mais frequente de infecção por *T. gondii* em que taquizoítos presentes no sangue materno podem atravessar a placenta e infectar o feto, tornando esta via uma das mais importantes, devido à gravidade das sequelas ao recém-nascido. O trimestre em que a toxoplasmose materna é adquirida constitui um fator importante na transmissão e gravidade da infecção congênita. (JONES; LOPEZ, 2003).

Outras formas de transmissão menos frequentes são relatadas na literatura, como: ingestão de taquizoítos em leite, acidente de laboratório, transplante de órgãos ou transfusão sanguínea de doadores infectados na fase proliferativa (DUBEY, 2010).

A toxoplasmose causada por transplante de órgãos ocorre geralmente pela presença de cistos teciduais no tecido transplantado ou em pacientes transplantados infectados com a forma latente do parasito, já que a terapia imunossupressora e citotóxica dada ao receptor do órgão é a causa de reativação do parasito, levando a forma ativa da doença (FRENKEL, 2002).

1.6. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

T. gondii apresenta um ciclo heteroxeno (Figura 7), no qual os felídeos são os hospedeiros definitivos por apresentarem uma fase sexuada nas células epiteliais do

intestino. Possui como hospedeiros intermediários, o homem e outros animais, onde ocorre a fase assexuada em células de todo o organismo (BLADER *et al.*, 2015).

Nos felídeos a infecção pode ocorrer pela ingestão de oocistos, cistos teciduais e taquizoítos, sendo que cerca de 50% dos felídeos eliminam oocistos após a ingestão de cistos teciduais (DUBEY, 2001; DUBEY, 2002). Posteriormente a ingestão de oocistos e/ou cistos ocorre à digestão das paredes destas formas evolutivas liberando esporozoítos e bradizoítos, respectivamente. A maioria dos taquizoítos que chega ao estômago é destruído, entretanto os que penetram na mucosa oral e/ou trato digestivo podem evoluir do mesmo modo que os oocistos e cistos teciduais (DUBEY, 1998).

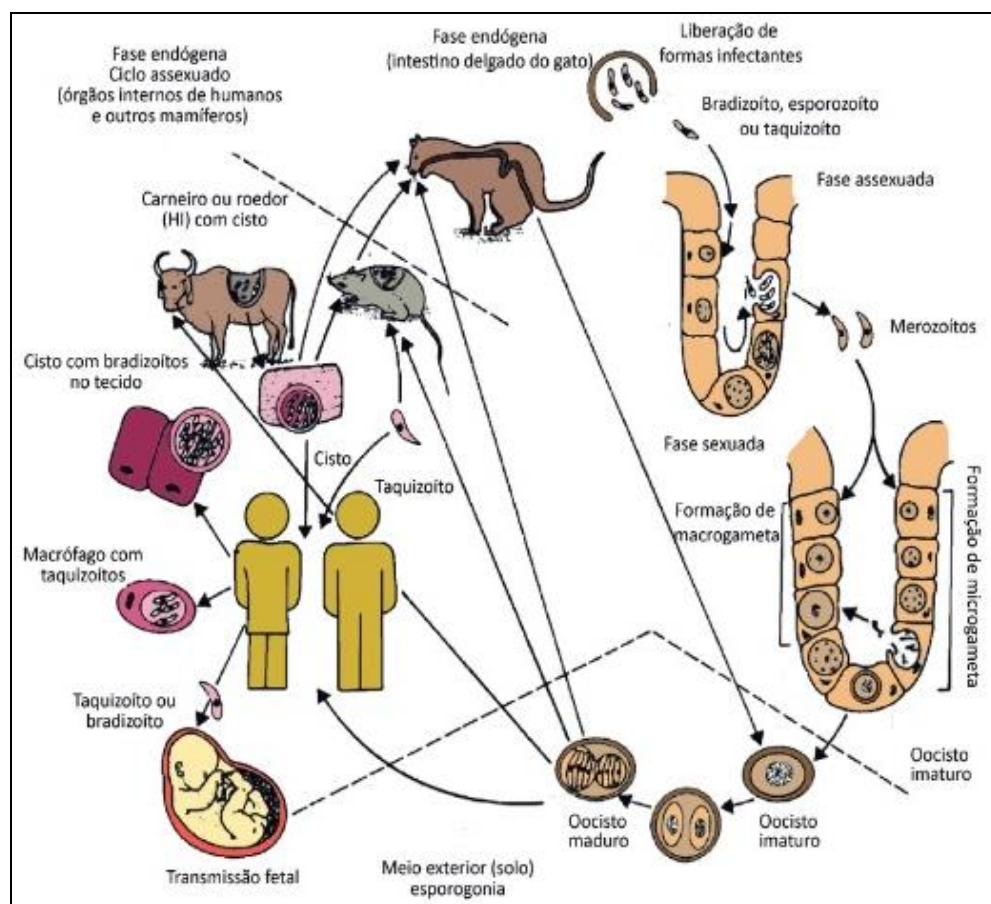


Figura 7: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Fonte: Adaptado de KAWAZOE (2003).

As formas infectantes penetram nos enterócitos dos felídeos onde ocorre intensa multiplicação intracelular denominada esquizogonia (reprodução assexuada), dando origem a merozoítos. Estes rompem as células hospedeiras e infectam novas células. No entanto, alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos que por um

processo de maturação formam os microgametas (gametas masculinos) e macrogametas (gametas femininos) (CENCI-GOGA, 2011; DUBEY, 1998).

Os microgametas se locomovem através de seus flagelos e penetram nas células epiteliais do intestino dos felídeos para fecundar os macrogametas, formando zigotos, os quais desenvolvem uma parede cística que posteriormente darão origem aos oocistos com dois esporocistos. Após as células epiteliais se romperem, milhões de oocistos atingem o meio externo através das fezes dos felídeos, ocorrendo a maturação pelo processo de esporogonia que em cerca de quatro dias apresenta dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (DUBEY, 1998).

O período entre a infecção e a eliminação de oocistos pelos felídeos varia de acordo com a forma evolutiva em que houve a infecção, sendo de 3 a 10 dias para cistos teciduais e de até 18 dias nos casos de ingestão de oocistos (DUBEY, 1998).

Assim como nos felídeos, o hospedeiro intermediário (homem, por exemplo) pode se infectar pela ingestão de oocistos, cistos teciduais e por taquizoítos, os quais sofrem a ação do suco gástrico e liberam as formas evolutivas bradizoítos (cistos teciduais) e esporozoítos (oocistos). Essas formas infectantes se diferenciam em taquizoítos que se replicam no vacúolo parasitóforo a cada 6 a 8 horas por endodiogenia, liberando novos taquizoítos que podem invadir diversas células do organismo (BLADER *et al.*, 2015; SKARIAH *et al.*, 2010).

A fase aguda é caracterizada pela disseminação de taquizoítos no organismo que pode causar diversas manifestações clínicas (linfadenopatia, quadro febril e hepatoesplenomegalia), cuja gravidade depende do número de formas infectantes, tipo da cepa do parasito e da susceptibilidade do hospedeiro. Os casos mais graves estão associados com pessoas imunocomprometidas, incluindo as gestantes, pois *T. gondii* é capaz de atravessar a placenta e causar sérias consequências ao feto, como: retinocoroidite, hidrocefalia e calcificações cerebrais (JONES; ROBERTS, 2012; SEVERANCE *et al.*, 2016; THULLIEZ, 2001).

Devido à resposta imune do hospedeiro imunocompetente, a fase crônica é estabelecida com a diminuição da sintomatologia e pela formação de cistos teciduais, os quais permanecem viáveis por muitos anos apresentando tropismo por tecido muscular esquelético e cardíaco, sistema nervoso central e olhos (SEVERANCE *et al.*, 2016). Esses cistos teciduais podem reativar, principalmente em pessoas imunocomprometidas e durante a gestação, gerando um quadro agudo com formação de taquizoítos (HO-YEN, 2009).

1.7. Epidemiologia da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica que apresenta uma prevalência de aproximadamente 30% da população mundial infectada. (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH *et al.*, 2010).

A prevalência da infecção por *T. gondii* varia de acordo com os hábitos alimentares, higiene, idade dos indivíduos infectados, regiões geográficas, características climáticas e medidas políticas de saúde e governo (MONCADA; MONTROYA, 2012; ROSSO *et al.*, 2008). Além disso, as variadas formas de infecção favorecem a exposição do homem a este parasito (GUO *et al.*, 2017; HILL; DUBEY 2016).

Em relação aos hábitos alimentares e idades dos indivíduos infectados, estudos têm demonstrado alta relevância epidemiológica. Said *et al.*, (2017) realizaram um estudo de caso-controle para identificar fatores de risco para infecção por *T. gondii* e demonstraram que o risco de infecção por ingestão de carne crua ou mal cozida de bovinos, aves e cordeiro foi maior em relação ao grupo controle. Na Alemanha, a soroprevalência aumentou de 20% na faixa etária de 18 a 29 anos para 77% na faixa etária de 70 a 79 anos (WILKING *et al.*, 2016).

Assim como a maioria dos protozoários, a prevalência de *T. gondii* é maior em países em desenvolvimento, como no Irã com 39,3% (DARYANI *et al.*, 2014), na Etiópia com 65,8% (TILAHUN *et al.*, 2016) e na Indonésia com 62,5% (RETMANASARI *et al.*, 2017). Entretanto é possível verificar uma prevalência significativa em países como os Estados Unidos com 11,14% (JONES *et al.*, 2018), Escócia com 13,2% (BURRELLS *et al.*, 2016), Irlanda com 16,07% (MCCAUGHEY *et al.*, 2017), Canadá com 27,2% (GOYETTE *et al.*, 2014) e França com 54,7% (GUIGUE *et al.*, 2018).

A América Latina apresenta características climáticas como temperatura, precipitação e umidade adequadas para que oocistos persistam e permaneçam viáveis no meio ambiente, favorecendo a infecção do homem e de outros animais (HALONEN; WEISS, 2013). Dessa forma, é possível verificar uma prevalência de 27,97% no México (GALVAN-RAMIREZ *et al.*, 2012) e acima de 60% especialmente em El Salvador (REMINGTON *et al.*, 2006) e Brasil (FRENKEL, 2002).

Na cidade de Ivaiporã, região sul do Brasil, a prevalência encontrada foi de 73,57% (MAREZE *et al.*, 2019), enquanto em São José do Rio Preto, São Paulo, a

prevalência foi de 48,1% em doadores de sangue (NAKASHIMA *et al.*, 2019). No estado de Mato Grosso, 66,9% da população estudada apresentaram IgG anti- *T. gondii* (SANTOS *et al.*, 2019) e ao longo do rio Negro, região norte, identificaram uma soroprevalência superior a 90% em populações indígenas (BÓIA *et al.*, 2008).

1.8. Toxoplasmose adquirida

A toxoplasmose adquirida é assintomática em 80 a 90% dos casos em decorrência da efetividade do sistema imunológico e quando sintomática apresenta linfadenopatia, quadro febril, hepatoesplenomegalia e rash cutâneo (HILL; DUBEY, 2002; SANTANA *et al.*, 2003). A linfadenopatia é a forma clínica mais comum podendo apresentar linfonodos de 0,5 a 3 cm de diâmetro principalmente na região da cabeça e pescoço, embora também possam acometer linfonodos axilares, inguinais, retroperitoneais e mesentéricos (HALONEN; WEISS, 2013).

Em pessoas imunocomprometidas podem ocorrer graus variáveis da doença e resultar na reativação do parasito, gerando problemas neurológicos e até mesmo o óbito. A toxoplasmose cerebral é a doença oportunista mais comum em pacientes com síndrome de imunodeficiência humana (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2009). As manifestações clínicas dependem da localização e do número de lesões presentes no cérebro podendo causar cefaléia, febre, déficits focais, convulsões, confusão mental, ataxia, letargia e alterações visuais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A toxoplasmose ocular pode ocorrer por infecção congênita, por infecção adquirida pós-natal, ou pela reativação da doença em indivíduos imunocomprometidos (JONES *et al.*, 2006). Na França, a incidência de toxoplasmose ocular causada por infecção adquirida é maior (23%) quando comparada à condição congênita (15%), entretanto apresenta um melhor quadro clínico em relação à infecção vertical (DELAIR *et al.*, 2008).

A toxoplasmose ocular é caracterizada por retinopatia necrosante e as lesões ativas apresentam-se como focos cinza-brancos de necrose na retina com coroidite adjacente, vasculite, hemorragia e vitreíte com formação de cicatrizes coriorretinianas (MAENZ *et al.*, 2014).

O conhecimento da infecção de *T. gondii* em humanos e animais gerou uma reconsideração do efeito patogênico em indivíduos imunocompetentes com toxoplasmose adquirida quanto a alterações no sistema nervoso. Há evidências de que o

parasito esteja relacionado com casos de distúrbios psiquiátricos, como depressão, ansiedade e esquizofrenia (TORREY *et al.*, 2012).

A esquizofrenia é uma doença cerebral grave que envolve percepção e cognição alteradas e é o distúrbio psiquiátrico mais relatado na literatura, entretanto sua etiologia ainda é incerta, sendo relacionada com fatores genéticos e ambientes. Estudos afirmam que indivíduos com esquizofrenia apresentam uma elevada prevalência de toxoplasmose e que os casos com títulos mais altos de anticorpos IgG estão relacionados com sintomas mais graves da psicose (TORREY *et al.*, 2006; TORREY *et al.*, 2012).

1.9. Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita pode ocorrer quando a gestante apresenta um quadro agudo da doença por meio de uma infecção primária, reativação de cistos teciduais e reinfecção. A infecção primária ocorre quando uma mulher soronegativa se infecta com *T. gondii* durante a gestação ou quatro meses antes da concepção, podendo ocasionar uma transmissão vertical (AVELAR *et al.*, 2015).

A infecção fetal por reativação de cistos teciduais engloba os casos de gestantes previamente imunocomprometidas. Alguns casos envolvendo gestantes imunocompetentes foram relacionados a uma redução da resposta celular durante a gestação, que pode intervir no controle dos parasitos em sua forma latente e elevar o risco de transmissão vertical (ANDRADE *et al.*, 2010; AVELAR *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2003). No entanto, trabalhos têm sido relatados na literatura demonstrando que a reinfecção de uma gestante anteriormente imune com uma nova cepa do parasito também pode ocasionar a toxoplasmose congênita (COSTA *et al.*, 2018; ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009).

A toxoplasmose congênita tem uma incidência global estimada de 1,5 casos por 1000 nascidos vivos (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013). O risco de transmissão fetal durante a infecção primária varia com a idade gestacional e estima-se que a probabilidade de infecção por *T. gondii* no primeiro trimestre é de 25%, 45% no segundo trimestre e de 65% no terceiro trimestre de gestação (MOSTAFAVI *et al.*, 2011).

Essas taxas podem ser reduzidas com medidas de prevenção durante a gestação como, por exemplo, a triagem pré-natal, a qual possibilita um diagnóstico precoce e tratamento adequado (MALDONADO *et al.*, 2017). O tratamento iniciado

dentro de três semanas após a soroconversão materna, reduz a chance de transmissão vertical em 52% quando comparado ao tratamento tardio (≥ 8 semanas após a soroconversão) (THIÉBAUT *et al.* 2007).

Na infecção congênita a gestante raramente apresenta sintomatologia, entretanto a infecção por *T. gondii* pode afetar o feto de maneira variada (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

O prognóstico da infecção congênita está indiretamente relacionado com o período de infecção. No primeiro trimestre, a infecção pode levar à morte fetal. Sinais clínicos da chamada tétrade de Sabin (retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões e calcificação intracerebral) são comuns no segundo trimestre e no terceiro trimestre de gestação geralmente a criança é assintomática, mas pode apresentar evidências da doença alguns dias, semanas ou meses após o parto (COSTA, 2012).

Apenas 15 a 20% das crianças que adquirem o parasito durante a gestação apresentam evidências da doença ao nascer. No entanto, sintomas inespecíficos podem aparecer como convulsões, paralisias, deficiência auditiva, dificuldades de aprendizagem, linfadenopatia, febre e erupção cutânea. (AVELINO *et al.*, 2003; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Em um estudo realizado nos Estados Unidos com crianças infectadas durante a gestação que apresentavam sintomatologia demonstrou que coriorretinite (92%), calcificações intracranianas (80%) e hidrocefalia (68%) foram os sinais clínicos mais frequentes (OLARIU *et al.*, 2011). No Brasil, os principais sinais clínicos também condizem com o estudo anterior, apresentando retinocoroidite em 54% dos casos, calcificações intracranianas e líquido cefalorraquidiano alterado em 37,5% dos casos (BISCHOFF *et al.*, 2016).

Em um estudo realizado por McLeod *et al.* (2006), 120 recém-nascidos infectados congenitamente por *T. gondii* foram tratados com pirimetamina e sulfadiazina e monitorados prospectivamente quanto aos resultados clínicos. Quando comparados aos casos não tratados, 80% apresentaram função motora normal, 64% não desenvolveram novas lesões oculares e em nenhum dos casos foi detectada perda auditiva neurossensorial.

A gravidade das lesões é maior quando a infecção ocorre durante os primeiros meses de gestação, porém esse não é o único fator responsável pelo quadro clínico da doença (PEYRON *et al.*, 2006). O efeito nocivo da toxoplasmose congênita

depende também da prevalência da doença na comunidade, da vulnerabilidade da gestante ao protozoário e da virulência da cepa de *T. gondii* (AVELINO *et al.*, 2003).

A prevalência de toxoplasmose em gestantes foi observada em estudos de diversos países (Tabela 1).

Tabela 1. Prevalência sorológica em gestantes cronicamente infectadas por *Toxoplasma gondii* em alguns países do mundo.

País	Prevalência (%)	Referência
Estados Unidos	14,9	JONES <i>et al.</i> , 2001
Irã	43	MIZANI <i>et al.</i> , 2017
Gana	92,5	AYI <i>et al.</i> , 2009
China	16,29	JIANG <i>et al.</i> , 2018
França	37	TOURDJMAN <i>et al.</i> , 2015
Itália	19	CAPRETTI <i>et al.</i> , 2014
Índia	48	BORKAKOTY <i>et al.</i> , 2016
Noruega	9,3	FINDAL <i>et al.</i> , 2015
Egito	67,5	EL DEEB <i>et al.</i> , 2012
Etiópia	81,8%	FENTA, 2019
México	6,2	ALVARADO-ESQUIVEL <i>et al.</i> , 2016
Áustria	34,4	PRUSA <i>et al.</i> , 2013
Japão	10,3	SAKIKAWA <i>et al.</i> , 2012
Reino Unido	17,3	FLATT; SHETTY, 2013

Legenda: % (Percentual).

A prevalência da infecção por *T. gondii* em gestantes no Brasil também varia de acordo com as regiões geográficas, como demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Prevalência sorológica em gestantes cronicamente infectadas por *Toxoplasma gondii* nas regiões do Brasil.

Região	Estado	Cidade	Prevalência (%)	Referência
Norte	PA	Belém	73	OLIVEIRA, 2002
	TO	Gurupi	68,7	DA SILVA <i>et al.</i> , 2015
Nordeste	SE	Aracaju	68,5	INAGAKI <i>et al.</i> , 2014
	CE	Fortaleza	68,6	SROKA <i>et al.</i> , 2010
	BA	Salvador	51	AVELAR <i>et al.</i> , 2017
	MA	Caxias	77,9	CÂMARA <i>et al.</i> , 2015
Centro-Oeste	GO	Goiânia	89%	AVELAR <i>et al.</i> , 2018
	MS	Campo Grande	91,6	FIGUEIRÓ-FILHO <i>et al.</i> , 2007
Sudeste	SP	São Paulo	68,8	GUIMARÃES <i>et al.</i> , 1993
	MG	Belo Horizonte	61,2	CARELLOS <i>et al.</i> , 2008
	SP	São José do Rio Preto	64,4	MATTOS <i>et al.</i> , 2011
Sul	RS	Porto Alegre	67,3	LAGO <i>et al.</i> , 2009
	PR	Região Noroeste	59	FEREZIN <i>et al.</i> , 2013

Legenda: % (Percentual).

1.10. Cepas de *Toxoplasma gondii*

A virulência de *T. gondii* depende da cepa do parasito, a qual é classificada em quatro genótipos denominados tipo I, II, III e IV. (BOUGHATTAS *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2011). Geneticamente, as linhagens são relativamente semelhantes diferindo apenas em 1 - 2% em relação aos nucleotídeos (SIBLEY *et al.*, 2009).

As cepas do tipo I são mais móveis do que as cepas menos virulentas e são capazes de migrar através das barreiras celulares, características que explicam a rapidez que se disseminam pelo organismo causando alta mortalidade (BARRAGAN; SIBLEY, 2002; BARRAGAN; SIBLEY, 2003). Essas cepas são amplamente distribuídas na América do Sul e estão relacionadas à toxoplasmose humana congênita e toxoplasmose ocular (HOWE; SIBLEY, 1995; PEYRON *et al.*, 2006).

As cepas dos tipos II e III estimulam respostas pró-inflamatórias mais fortes em seus hospedeiros que ajudam a reduzir a disseminação e a patologia induzida pelo parasito (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). As cepas do tipo II, comumente encontradas nos Estados Unidos e na Europa, apresentam virulência intermediária e estão relacionadas aos casos de reativação da infecção crônica em humanos (PEYRON *et al.*, 2006). As cepas do tipo III são menos virulentas e frequentemente isoladas na América do Sul e estão associadas às infecções animais (PEYRON *et al.*, 2006). As cepas do tipo

IV, encontradas na América do Norte, estão relacionadas às infecções em animais silvestres e ocasionalmente em humanos (KHAN *et al.*, 2011).

No Brasil, foram identificados genótipos de *T. gondii* obtidos de animais e humanos no estado de Minas Gerais e comparados com os encontrados em outras regiões do país. Os genótipos clonais mais prevalentes foram BrI (virulento), BrII (virulência intermediária) e BrIII (avirulentos), além do genótipo clonal Tipo III (SILVA *et al.*, 2014).

Com os avanços de metodologias moleculares visando métodos de genotipagem mais específicos/sensíveis, foi possível detectar genótipos atípicos de *T. gondii* em diversos países, como demonstrado no estudo de Pomares *et al.* (2018) que detectou genótipos atípicos em 43,9% das amostras provenientes de humanos, originados principalmente da América Latina. Assim como o estudo de Shwab *et al.* (2014) que realizou genotipagem de 1.500 amostras em todo o mundo e identificou 189 genótipos diferentes de *T. gondii*, indicando elevada diversidade genética no Brasil devido aos genótipos atípicos encontrados em animais.

A diversidade genética de *T. gondii* pode estar relacionada com a gravidade dos sinais clínicos em crianças infectadas durante a gestação. A maioria dos casos de toxoplasmose congênita com genótipos atípicos apresenta prognóstico insatisfatório, independentemente do tratamento. Além disso, as consequências causadas no feto pelas infecções destas cepas no terceiro trimestre de gestação apresentam ser mais graves quando comparadas às cepas do tipo II (DELHAES *et al.*, 2010).

De acordo com Garweg (2016), a toxoplasmose ocular apresenta um quadro clínico mais grave em indivíduos procedentes da América do Sul em relação aos europeus, devido à maior incidência de cepas virulentas. Ademais, verificou que a inflamação ocular é inicialmente mais acentuada nos casos de infecção adquirida quando comparados aos casos congênitos, entretanto a acuidade visual final é geralmente melhor e o risco de recorrência menor, demonstrando a importância de um marcador de prognóstico da toxoplasmose congênita.

1.11. Resposta imune na toxoplasmose

A invasão à célula hospedeira ocorre por penetração ativa, um mecanismo dependente de actina e miosina com o auxílio de proteínas secretadas pelas organelas apicais do parasito. Uma vez dentro da célula, *T. gondii* inicia o processo de replicação

no vacúolo parasitóforo, culminando na ruptura e na invasão de novas células do hospedeiro (CESBRON-DELAUW *et al.*, 2008).

Os hospedeiros desencadeiam durante a fase aguda da infecção mecanismos inatos de defesa, os quais influenciam o desenvolvimento da resposta adaptativa. *T. gondii* é capaz de estimular o recrutamento e de infectar células dendríticas, macrófagos e neutrófilos facilitando a disseminação do parasito por todo o organismo, incluindo o cérebro (DUPONT *et al.*, 2012).

Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas secretam IL-12 após a infecção pelo parasito, a qual desencadeia a síntese de IFN- γ pelas células “Natural Killer” (NK) e células T (DUPONT *et al.*, 2012).

Além da produção de IL-12, os monócitos inflamatórios expressam óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), enzima responsável por catalisar a produção de óxido nítrico, o qual controla a proliferação de *T. gondii* (DUNAY; SIBLEY, 2010). Os neutrófilos também apresentam outros mecanismos efetores que matam diretamente os parasitos, incluindo a fagocitose e a liberação de espécies químicas reativas (NAKAO; KONISHI, 1991).

As células dendríticas desempenham um papel importante na resposta imune inata e adaptativa, sendo as principais células apresentadoras de antígenos no local da infecção. Em relação às células NK, estas apresentam grande atividade no início da infecção com a síntese de IFN- γ . Entretanto na fase crônica essa atividade não demonstra ser significativa para a resposta imune. Além disso, estas células produzem IL-10, a qual desempenha papel modulador na síntese de IL-12 e IFN- γ , evitando uma resposta imune excessiva que poderia causar danos aos tecidos do hospedeiro (KANG; SUZUKI, 2001; PERONA-WRIGHT *et al.*, 2009).

A resposta imune adaptativa é iniciada por células apresentadoras de antígenos, as quais reconhecem que o hospedeiro está infectado através de receptores, como Toll Like (TLRs) (TAIT; HUNTER, 2009). As citocinas produzidas após o contato com os antígenos estimulam a diferenciação dos linfócitos T CD4+. A IL-12 é responsável pela diferenciação em linfócitos Th1, enquanto a IL-4 e IL-10 estimulam a diferenciação em linfócitos Th2, envolvidos na imunidade humoral (MOSMANN, 1991; TRINCHIERI, 1993).

T CD4 + são células que quando ativadas produzem IL-2 que em conjunto com o IFN- γ , resultam em um grande número de células T CD4 + e células T CD8 + antígeno-específico, as quais produzem IFN- γ nos locais de invasão do parasito. A

sinalização de IFN- γ , em uma via dependente de STAT-1, leva à geração de mecanismos efetivos antiparasitários, como o óxido nítrico, intermediários reativos de oxigênio e as GTPases reguladas pela imunidade (DUPONT *et al.*, 2012).

T CD8 + desempenham um papel crucial na imunidade protetora contra *T. gondii* através da produção de IFN- γ que ativa mecanismos de eliminação do parasito como a via dependente de perforina. A infecção crônica no cérebro é controlada pelas células T CD8 +, pelas células gliais residentes, micróglias e astrócitos, que podem atuar como células efetoras imunes no cérebro (DZIERSZINSKI *et al.*, 2007).

O papel fundamental das células T produtoras de IFN- γ está relacionado com o controle da infecção durante a fase aguda e crônica. Dessa forma, em indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida, em que ocorre o declínio de células T CD4 + e consequentemente o declínio de IFN- γ é comum à reativação de cistos teciduais (BERAN *et al.*, 2015).

Nas gestantes, ocorre um estado relativo de imunocomprometimento causado pela diminuição de linfócitos T que geram uma supressão de citotoxicidade celular, inclusive das células NK. Essas alterações naturais podem facilitar a proliferação de taquizoítos na placenta e consequentemente a infecção fetal (BELLANTI *et al.*, 1999).

Pela característica da resposta imune fetal, a replicação de *T. gondii* nos tecidos é mais intensa, devido à ativação deficiente dos macrófagos e menor produção de citocinas pelos linfócitos T em relação aos adultos (BELLANTI *et al.*, 1999). As diferenças da resposta imune entre indivíduos com toxoplasmose adquirida e toxoplasmose congênita foi determinada por Yamamoto *et al.* (2000), que demonstrou menor atividade de células T e de secreção de citocinas (IL-2 e IFN- γ) em indivíduos com toxoplasmose ocular congênita quando comparados aos pacientes com toxoplasmose ocular adquirida.

Para os linfócitos B serem ativados para a produção de anticorpos contra antígenos de *T. gondii* é necessário à participação dos linfócitos T CD4+ Th2 através da produção de citocinas tais como IL-4 (DUPONT *et al.*, 2012).

As imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B englobam as classes IgG, IgM, IgA e IgE, as quais são dirigidas a antígenos excretados e secretados ou da superfície da membrana do parasito. Anticorpos podem mediar seus efeitos protetores através de vários mecanismos, como a opsonização dos parasitos para a fagocitose, bloqueio da invasão a novas células do hospedeiro e ativação da via clássica do

complemento promovendo a lise de taquizoítos extracelulares. No entanto, os anticorpos não são capazes de combater parasitos intracelulares (DUPONT *et al.*, 2012).

Os anticorpos IgA e IgM são sugestivos de infecção aguda e produzidos durante a primeira semana após a infecção, alcançando elevados níveis dentro de um mês, entretanto devido à meia vida estes anticorpos tornam-se indetectáveis após algumas semanas (Figura 8) (MURAT *et al.*, 2015). As imunoglobulinas IgM e IgA não atravessam a barreira placentária, portanto são marcadores de infecção aguda/ativa e congênita quando detectada no soro de recém-nascidos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

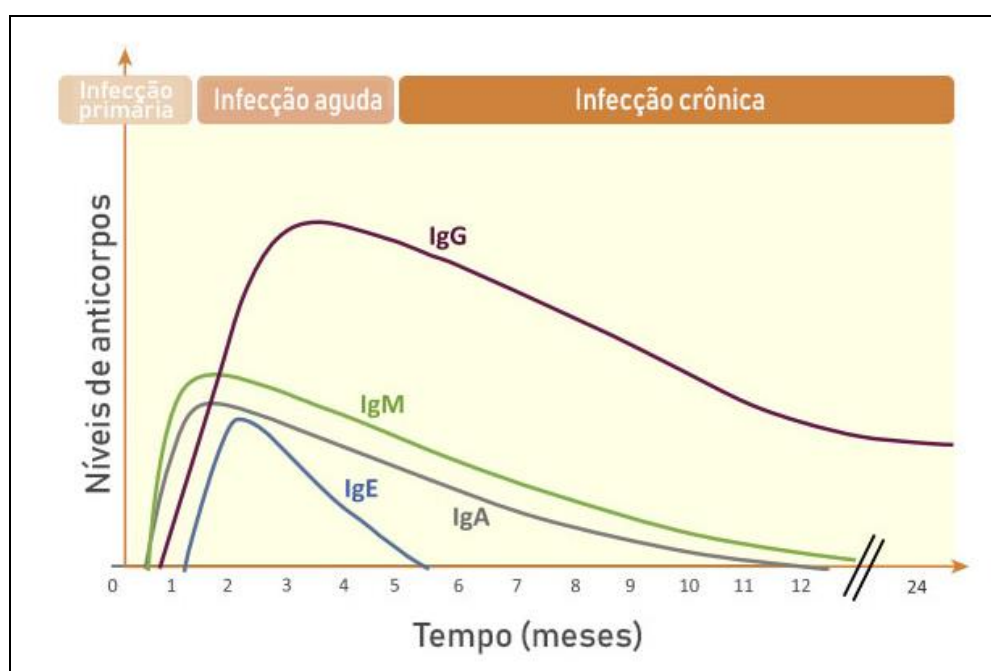


Figura 8: Níveis de imunoglobulinas após a infecção primária por *Toxoplasma gondii*. Fonte: Adaptação de DARDÉ *et al.*, 2016.

Assim como os anticorpos produzidos na fase aguda da toxoplasmose, IgE também não atravessa a barreira placentária, o que protege o feto contra sensibilizações alérgicas maternas. Os níveis de IgE atingem o pico após três meses de infecção e diminuem rapidamente, sendo indicador de infecção corrente (ASHBURN *et al.*, 1995).

Os anticorpos IgG são característicos da infecção crônica e apresentam quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Na regulação da resposta imunitária contra antígenos parasitários, os anticorpos produzidos são usualmente das subclasses IgG1 e IgG3, devido à capacidade de fixação do complemento (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

As imunoglobulinas IgG aparecem após duas semanas da produção de IgM, chegando ao pico em aproximadamente dois a três meses e, em seguida, decresce a um nível residual médio. Esta característica permite que a pesquisa de IgG seja utilizada para o diagnóstico, acompanhamento e estudos epidemiológicos da toxoplasmose em todo o mundo (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.12. Antígenos de *Toxoplasma gondii*

1.12.1. Antígenos de superfície

Durante a fase aguda da toxoplasmose, os taquizoítos ativam uma potente resposta imune no hospedeiro por meio de antígenos, os quais têm sido identificados por diversas técnicas moleculares, como: eletroforese bidimensional, imunoprecipitação e espectrometria de massas (BEZERRA JÚNIOR *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2019).

Os antígenos de superfície (SAGs) apresentam papel importante neste processo, assim como na aderência e na invasão à célula hospedeira (LEKUTIS *et al.*, 2001), como demonstrado na Figura 9. Estas proteínas são classificadas de acordo com sua massa molecular, sendo as principais SAG1 (P30), SAG2 (P22) e SAG3 (P43). Além destes, múltiplos antígenos de superfície foram identificados, como: SRS1, SRS2, SRS3 (P35), SRS4, SRS5, SRS6, SRS7, SRS8, BSR4 (P36), SAG2B, SAG2C, SAG2D, SAG2E, SAG4A (P18), SAG4B, SAG5A, SAG5B e SAG5C (LEKUTIS *et al.*, 2001). Essas proteínas apresentam semelhanças que envolvem tanto as sequências genéticas quanto as funções durante o processo de infecção no hospedeiro, sugerindo sua evolução a partir de uma proteína ancestral (CESBRON-DELAUW *et al.*, 1994).

SAG1 apresenta um peso molecular de 30 kDa e é um importante ligante no processo de invasão do parasito à célula do hospedeiro através de receptores celulares. Esse processo foi comprovado por Bishop *et al.* (2015), demonstrando inibição da ligação da célula hospedeira com taquizoítos com quantidade reduzida de SAG1 em suas superfícies.

SAG1 é altamente imunogênica, gerando resposta imune humoral e celular no hospedeiro após a infecção por *T. gondii*. A imunidade celular é o principal mecanismo pelo qual o SAG1 induz o hospedeiro a gerar proteção imunológica através da ação de linfócitos T e de citocinas (FANG *et al.*, 2012; GAZZINELLI *et al.*, 1991).

Assim como SAG1, SAG2 participa na ligação e invasão celular, visto que anticorpos anti-SAG2 são capazes de inibir a ligação do parasito nas células do

hospedeiro (LEKUTIS *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2010). Além disso, interage com uma série de proteínas da célula hospedeira, as quais estão envolvidas nos processos de penetração, formação de vacúolo parasitóforo, divisão celular e proliferação celular (LAI; LAU, 2017).

O antígeno de superfície 3 (SAG3) é uma glicoproteína com peso molecular de 43 kDa, a qual é ligada à membrana ancorada por glicosilfosfatidilinositol presentes nas formas de taquizoítos e bradizoítos (KAZEMI *et al.*, 2007). A ligação de SAG3 à proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs) facilita a ligação do parasito à superfície da célula hospedeira (JACQUET *et al.*, 2001).

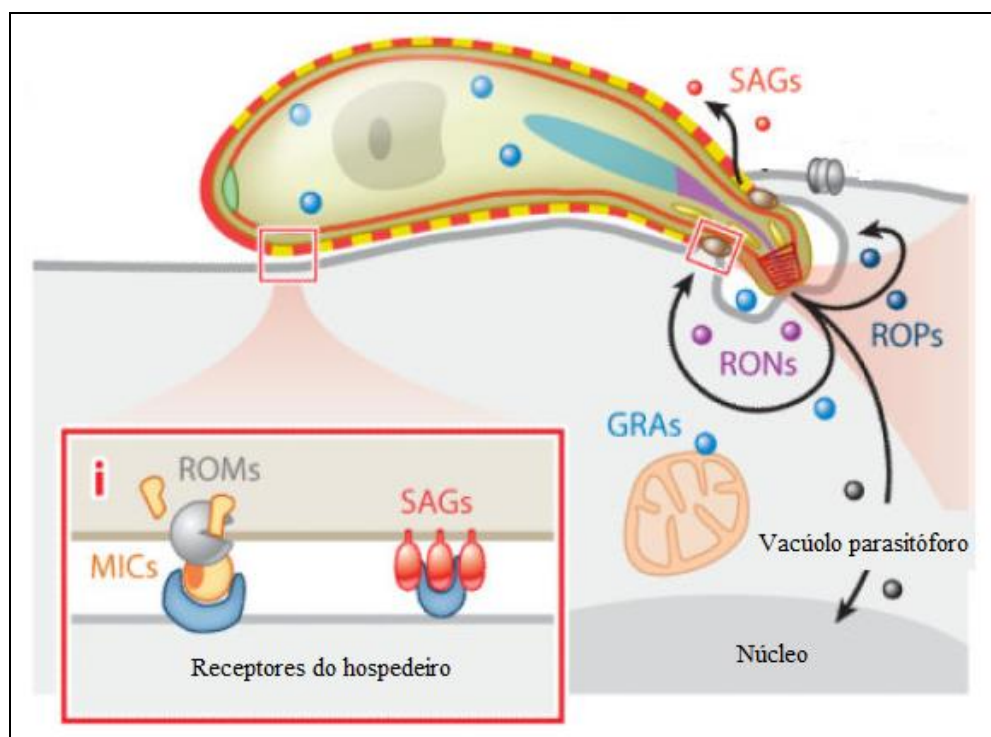


Figura 9: Esquema dos processos de adesão e invasão de *Toxoplasma gondii* à célula hospedeira. Fonte: Adaptação de Blader *et al.*, 2015.

1.12.2. Antígenos excretados/secretados

As organelas secretoras denominadas micronemas, roptrias e grânulos densos que fazem parte do complexo apical de *T. gondii*, demonstraram ser importantes para a invasão, replicação e sobrevivência do parasito no interior das células hospedeiras (CARRUTHERS, 2002).

Os antígenos excretados/secretados (ESAs) são liberados por estas organelas e expressos na superfície ou no lisado de taquizoítos e bradizoítos, apresentando um papel importante na estimulação do sistema imune. Estes antígenos

constituem 90% dos antígenos circulantes em soros de hospedeiros com toxoplasmose aguda e durante a reativação da infecção em pacientes imunocomprometidos, demonstrando ser marcadores sorológicos promissores desta infecção (CESBRON; CAPRON, 1993).

Micronemas são pequenas estruturas em forma de bastonete, localizadas na região apical, que secretam proteínas (MICs) envolvidas no reconhecimento e adesão durante o processo de invasão das células hospedeiras (MEISSNER *et al.*, 2002).

As MICs são as primeiras a serem secretadas durante o contato do parasito com a célula do hospedeiro, facilitando a adesão através do reconhecimento de receptores (MEISSNER *et al.*, 2002). Até o momento foram descritos 19 tipos de MICs (kDa): MIC1 (49), MIC2 (83), MIC3 (90), MIC4 (63), MIC5 (20), MIC6 (37), MIC7 (36), MIC8 (75), MIC9 (32), MIC10 (23), MIC11 (22), MIC12 (234), AMA1 (60), M2AP (35), SUB1 (85), ROM1 (28), SPATR (47), PLP1 (124), TLN4 (256) (WANG & YIN, 2015).

Alguns complexos formados por MICs atuam de maneira distinta no processo de invasão. O complexo MIC2-M2AP está envolvido na motilidade de deslizamento (HUYNH *et al.*, 2003), enquanto MIC6-MIC1-MIC4 contribui para a adesão e invasão do parasito (REISS *et al.*, 2001). Por outro lado, MIC3-MIC8 está associado à secreção de proteínas das roptrias (CÉRÈDE *et al.*, 2002).

SUB1 e ROM1 codificam uma protease candidata para várias proteínas micronemas que são clivadas dentro da via secretória do parasito, desempenhando um papel significativo no processo de invasão (BROSSIER *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2001).

Roptrias são organelas maiores que os micronemas, onde estão contidas proteínas que apresentam papel importante na penetração do parasito à célula hospedeira, na formação da membrana do vacúolo parasitóforo e da resposta imune (SOUZA *et al.*, 2010).

Na literatura é relatada a presença de 39 proteínas no interior das roptrias, e sabe-se que 24 estão localizadas na porção basal (ROPs) e nove na extremidade apical (RONs), entretanto este número vem aumentando com pesquisas voltadas para esta organela (BRADLEY *et al.*, 2005; LAMARQUE *et al.*, 2012; CAMEJO *et al.*, 2014).

Após o processo de adesão, proteínas presentes nas roptrias de *T. gondii* são descarregadas no citosol da célula hospedeira. RON2, RON4 e RON5 compõem um

complexo que em associação à AMA1 formam a junção móvel e um anel através do qual o parasito penetra na célula (LAMARQUE *et al.*, 2014).

As proteínas mais abundantes nas roptrias são aquelas relacionadas a família ROP2, incluindo ROP4, ROP7 e ROP8 (HANKS; HUNTER, 1995). A proteína ROP2 demonstrou estar inserida na membrana do vacúolo parasitóforo, onde medeia a associação de mitocôndrias e retículo endoplasmático da célula hospedeira (BECKERS *et al.*, 1994).

Estudos relatam que ROP5, juntamente com ROP17 e ROP18, controla a virulência de *T. gondii* através do bloqueio de mecanismos autônomos de liberação imunológica ativados por IFN- γ nas células hospedeiras infectadas (ETHERIDGE *et al.*, 2014). Por outro lado, ROP16 atua sob a virulência através da fosforilação de STAT3, um regulador negativo das respostas imunitárias Th1 (YAMAMOTO *et al.*, 2009).

A secreção de proteínas GRA presentes nos grânulos densos de *T. gondii* demonstrou ocorrer após a formação do vacúolo parasitóforo, no final do processo de invasão do parasito (CARRUTHERS; SIBLEY, 1997). A localização após a secreção de proteínas evidenciou o papel destas no processo de maturação do vacúolo parasitóforo e na formação de cisto na célula hospedeira (MERCIER; DELAUW, 2012).

As proteínas presentes nos grânulos densos são: GRA3 (30 kDa), GRA5 (21 kDa), GRA7 (29 kDa), GRA8 (38 kDa), GRA14 (44.71 kDa), GRA19, GRA20 (45.19 kDa), GRA21 (55.45 kDa) e GRA23 (24.15 kDa) são incorporadas à membrana do vacúolo parasitóforo enquanto as proteínas GRA2 (28.5 kDa), GRA4 (40 kDa), GRA6 (32 kDa), GRA9 (41 kDa) e GRA12 (47.92 kDa) formam um complexo que interage e estabiliza a membrana da rede intravacuolar (HSIAO *et al.*, 2013; MASATANI *et al.*, 2013; MERCIER; DELAUW, 2012). Recentemente, uma nova proteína (GRA41) foi identificada, a qual é secretada no vacúolo parasitóforo e demonstrou estar associada à homeostase do parasito pela regulação de cálcio (LAFEVERS, *et al.*, 2017).

Além da manutenção do vacúolo parasitóforo, as proteínas GRA apresentam papel importante na estimulação da resposta imune do hospedeiro. Células T CD4 + específicas para o GRA2 demonstraram estar envolvidas na manutenção da imunidade em indivíduos cronicamente infectados (CHA *et al.*, 2001).

GRA4 demonstrou provocar respostas imunes sistêmicas e nas mucosas após infecção oral de cistos em camundongos. Além disso, apresentou resultados promissores como candidata à vacina contra toxoplasmose (MEVELEC *et al.*, 1998; SHADDEL *et al.*, 2018).

O conhecimento do papel de cada uma destas proteínas durante a infecção por *T. gondii* em seus hospedeiros tem beneficiado o desenvolvimento de ensaios sorológicos com maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da toxoplasmose, como demonstrado por Luo *et al.* (2019), em que as proteínas GRA2, GRA7 e triosefosfato isomerase (TPI) apresentaram um elevado valor diagnóstico para a detecção da doença.

1.13. Diagnóstico da toxoplasmose

1.13.1. Diagnóstico clínico

A infecção por *T. gondii* geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes, mas pode causar uma ampla gama de sinais e sintomas clínicos com risco de morte em casos de infecção congênita e em pacientes imunocomprometidos (HALONEN; WEISS, 2013).

Na toxoplasmose adquirida sintomática, os principais sinais clínicos envolvem febre, mal-estar e linfadenopatia, apresentando quadros mais graves em imunocomprometidos, como cefaleia, convulsões e confusão mental (HALONEN; WEISS, 2013).

Na toxoplasmose congênita cerca de 80% das crianças nascem sem nenhuma manifestação clínica, dificultando a suspeita da infecção e consequentemente levando ao negligenciamento de um diagnóstico conclusivo de infecção congênita, principalmente as que nascem de uma gestação não considerada de risco. Nos casos sintomáticos as principais características clínicas pertencem à tétrede de Sabin que envolve alterações do volume craniano, retinocoroidite, calcificações intracranianas e retardamento mental (MCAULEY, 2014; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Tanto as manifestações clínicas da toxoplasmose adquirida quanto da toxoplasmose congênita apresentam quadro clínico inespecífico, podendo ser confundidas com doenças causadas por outros agentes infecciosos, tais como citomegalovírus (CMV), rubéola ou infecções virais de herpes, demonstrando a importância e a necessidade do diagnóstico laboratorial para confirmação da infecção por *T. gondii* (JONES *et al.*, 2003).

1.13.2. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial de toxoplasmose baseia-se na detecção direta de *T. gondii* e pela detecção indireta utilizando ensaios imunológicos. Nos casos de toxoplasmose congênita e de toxoplasmose adquirida em imunocomprometidos exames de imagem também devem ser realizados (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; HALONEN; WEISS, 2013).

Quando a mulher se infecta durante a gestação as medidas para confirmação da infecção fetal envolvem a realização de ultrassonografia para monitorar o desenvolvimento fetal e punção de líquido amniótico e/ou sangue fetal, os quais são submetidos a testes sorológicos e parasitológicos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Após o nascimento, existem estratégias complementares para diagnosticar a infecção congênita: detecção de anticorpos específicos (IgM, IgA, IgG em títulos crescentes) e detecção do parasito no sangue do cordão ou no sangue periférico do recém-nascido (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.13.2.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico da toxoplasmose é geralmente disponibilizado em laboratórios de referência, apresenta baixa sensibilidade e deve ser indicado durante a fase aguda ou quando há suspeita de reativação e/ou reagudização da infecção (MURAT *et al.*, 2013).

A identificação e isolamento do parasito podem ser realizados pela inoculação do material biológico suspeito em animais de experimentação e cultura de células (MONTROYA, 2002). Estes isolados têm sido amplamente utilizados em estudos científicos para caracterização de *T. gondii*, como demonstrado por Pinheiro *et al.* (2015) e Dunay *et al.* (2008) que com a infecção oral com cistos teciduais em camundongos, efeitos patológicos foram observados em órgãos frequentemente afetados pelo parasito.

As técnicas moleculares têm sido foco das pesquisas com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) como alternativa ao diagnóstico parasitológico e sorológico, visto que a detecção de DNA do parasito não depende do estado imunológico do paciente e este ensaio pode ser aplicado em diversas amostras, como líquido, líquido amniótico, sangue periférico (especialmente a camada leucocitária, visto que *T. gondii* é um protozoário intracelular) e placenta (GARIBYAN; AVASHIA,

2013; OLIVEIRA AZEVEDO *et al.*, 2016). Por outro lado, esta técnica apresenta elevado custo e exige controles rigorosos para evitar resultados falsos negativos (GARIBYAN; AVASHIA, 2013; HALLUR *et al.*, 2015).

O primeiro protocolo de PCR para *T. gondii* foi realizado por Burg *et al.* (1989), onde descreveu a sequência do gene B1, dando início a elaboração de protocolos para a detecção de novas sequências-alvo do DNA do parasito, como os genes TGR (CRISTINA *et al.*, 1991) e Rep529 (ROBERT-GANGNEUX *et al.*, 2010).

Em estudos realizados com pacientes imunocomprometidos, a PCR apresentou sensibilidade entre 35 a 72% em líquido cefalorraquidiano e 15 a 80% em sangue periférico (ROBERT-GANGNEUX; BELAZ, 2016). Em relação ao uso desta técnica em líquido amniótico realizada até cinco semanas após o diagnóstico materno, a sensibilidade foi de 87% e a especificidade de 99% (OLIVEIRA AZEVEDO *et al.*, 2016).

1.13.2.2. Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos são os métodos mais empregados no diagnóstico da toxoplasmose. Eles detectam imunoglobulinas específicas de *T. gondii* e variam de acordo com a metodologia, tipos de antígenos utilizados para elaboração dos kits e isotipos de imunoglobulinas detectadas no material biológico do paciente (DARD *et al.*, 2016).

A confirmação da toxoplasmose baseia-se principalmente na detecção de anticorpos IgM e IgG, entretanto a pesquisa de IgA também é realizada, principalmente nos casos que há necessidade de determinar a fase da infecção (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O antígeno bruto é utilizado na maioria dos testes sorológicos comerciais disponíveis, o qual é obtido a partir de lavados peritoneais de camundongos ou de cultura de células. No entanto, antígenos recombinantes têm sido produzidos a partir de técnicas de clonagem e expressão gênica com a finalidade de desenvolver imunoenaios mais padronizados com maior sensibilidade e especificidade (HOLEC-GASIOR, 2013).

Os antígenos de superfície SAG1, SAG2 e SAG3 recombinantes apresentam ser bons candidatos para o diagnóstico de toxoplasmose, visto que demonstram elevada sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* quando comparados ao kit comercial de ELISA (KHANALIHA *et al.*, 2014).

Da mesma forma, ROP5 e ROP18 demonstraram ser promissores no diagnóstico laboratorial devido ao reconhecimento de anticorpos específicos produzidos durante infecções agudas e crônicas em camundongos (GRZYBOWSKI *et al.*, 2015), assim como GRA7 na comparação com a técnica molecular de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), em pacientes com toxoplasmose (ARAB-MAZAR *et al.*, 2016).

Além disso, MIC3 demonstrou ser um marcador promissor para o diagnóstico de infecções agudas, pois pode detectar anticorpos IgG de baixa avidéz exclusivamente em soros coletados dentro de 2 meses após a infecção primária (BEGHETTO *et al.*, 2003).

O diagnóstico de toxoplasmose aguda em gestantes, em muitos casos, torna-se desafiador, visto que estas mulheres podem apresentar IgM residual em até um ano após a infecção (YAMADA *et al.*, 2019). O teste de avidéz é um método complementar utilizado no diagnóstico de toxoplasmose, sendo particularmente útil para a diferenciação de infecções maternas agudas e crônicas (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; YAMADA *et al.*, 2019). A detecção de uma baixa avidéz de IgG anti-*T. gondii* é um indicador para toxoplasmose recente, enquanto uma alta avidéz demonstra que a infecção ocorreu após 12-16 semanas. No entanto, este teste apresenta um valor limitado quando realizado após o pico de produção de anticorpos IgG (POMARES; MONTOYA 2016).

A confirmação da infecção por *T. gondii* no recém-nascido baseia-se na detecção de anticorpos IgM e IgA e na detecção direta do parasito, entretanto entre 15 a 55% dos neonatos infectados congenitamente não apresentam estas classes de imunoglobulinas logo após o nascimento (BOLLANI *et al.*, 2013; GUY, 2014). Lago *et al.* (2014) demonstrou que em 19,6% das crianças com toxoplasmose congênita esses anticorpos já estavam negativos aos 30 dias de vida e em 54,9% aos 90 dias.

A ausência de IgM anti-*T. gondii* nos recém-nascidos pode ser justificada pela fase da gestação em que ocorreu a infecção ou como resultado do tratamento materno, que pode causar bloqueio ou atraso da resposta imune (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Os anticorpos IgG anti-*T. gondii* não são marcadores de infecção congênita, pois IgG provenientes das mães atravessam a placenta e podem permanecer circulantes no sangue da criança (POMARES; MONTOYA, 2016). Assim, a presença de anticorpos IgG sugere ocorrência de infecção congênita quando o título dessa classe de

imunoglobulinas permanece estável ou ascendente até o primeiro ano de vida da criança (POMARES; MONTOYA, 2016).

Na literatura é relatado que o diagnóstico dessa infecção deve ser confirmado ou excluído no decorrer de 12 meses nos casos inconclusivos, porém não se pode descartar a possibilidade de uma infecção após o nascimento (POMARES; MONTOYA, 2016). Como demonstrado por Rezende *et al.* (2017), que relatou um caso de toxoplasmose adquirida em um lactante de seis meses de idade, cuja mãe apresentava sorologia negativa, demonstrando que a toxoplasmose adquirida pode ser confundida com a toxoplasmose congênita durante a triagem neonatal.

Além disso, há casos em que os níveis de IgG não são detectados durante a terapia, sendo necessário o acompanhamento sorológico e clínico após o tratamento ser interrompido (POMARES; MONTOYA, 2016).

Existem diversos testes sorológicos disponíveis no mercado para o diagnóstico da toxoplasmose, sendo os principais:

Reação de imunofluorescência indireta (IFI): é um teste de baixo custo e de referência para a toxoplasmose, pois apresenta boa sensibilidade (80,4 - 100%) e especificidade (91,4 – 95,8%) (SHAAPAN *et al.*, 2008). As desvantagens envolvem resultados falso-positivos de IgM pela interferência de fatores reumatóides presentes no soro, resultados falso-negativos de IgM, devido a competição entre anticorpos IgG e IgM, o que pode impedir que se fixem nos antígenos de *T. gondii* e pela necessidade de profissionais qualificados para análise dos resultados (CAMARGO, 2001).

Imunoensaio enzimático (ELISA): é o teste sorológico mais utilizado nos laboratórios de rotina, devido a sua elevada sensibilidade (95,3%), especificidade (98,3%) e automação (IDDAWELA *et al.*, 2015).

Reação de Aglutinação por Imunoabsorção (ISAGA): é um teste geralmente utilizado para detecção de anticorpos IgM e IgA, pois apresenta especificidade superior a 97% (MURAT *et al.*, 2015).

Immunoblotting: é uma técnica manual e baseia-se na reação de anticorpos (IgM e IgG) com antígenos de *T. gondii* fixados em uma membrana de nitrocelulose, os quais foram transferidos de um gel de poliacrilamida que por uma corrente elétrica separa as proteínas de acordo com seu peso molecular (CAPOBIANGO *et al.*, 2016).

Segundo Stroehle *et al.* (2005), esta técnica apresentou sensibilidade de 98,5% e especificidade de 100% para detecção de anticorpos em amostras de saliva de indivíduos com toxoplasmose. Por outro lado, em um estudo com amostras de soro de

pacientes com toxoplasmose, a sensibilidade foi de 46,8% em infecções agudas e de 61,2% em infecções crônicas, utilizando antígeno GRA5 recombinante (CHING *et al.*, 2014).

O diagnóstico tardio da toxoplasmose congênita nos casos inconclusivos pode ser solucionado pela técnica de Immunoblotting, pois permite uma análise qualitativa por comparação de padrões de bandas do soro do recém-nascido com o soro da mãe. De acordo com Robert-Gangneux *et al.* (1999), a comparação desse perfil sorológico apresentou uma sensibilidade de 94% e de 100% em combinação com ELISA. No entanto, é um método que demanda tempo, profissionais qualificados e é propenso a erros, devido ao protocolo extenso (CAPOBIANGO *et al.*, 2016; GOSH *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é considerada uma importante causa mundial de mortalidade e morbidade infantil, constituindo um problema de saúde pública.

O diagnóstico desta infecção, em muitos casos, torna-se tardio, pois a maioria dos recém-nascidos infectados durante a gestação é assintomática. No entanto, sinais clínicos podem se manifestar em dias, meses ou anos após o nascimento, demonstrando a necessidade de estudos que possam auxiliar no prognóstico desses pacientes.

Além disso, geralmente não são detectados anticorpos IgM e IgA anti-*T.gondii* durante o acompanhamento neonatal, sendo necessária a triagem de anticorpos IgG anti-*T.gondii* até o primeiro ano de vida da criança para confirmação da infecção nos casos suspeitos. Dessa forma, mesmo com a utilização de diferentes metodologias laboratoriais, em alguns casos, essas técnicas não determinam se a infecção é proveniente de transmissão congênita ou adquirida quando realizadas após o nascimento, devido à exposição ao parasito presente no meio ambiente.

No que se refere às gestantes, é comum a presença de IgM anti-*T. gondii* residual, ou seja, que pode ser detectado por mais de um ano após a infecção, dificultando o diagnóstico principalmente no primeiro trimestre de gestação.

Vários autores têm sugerido o uso de antígenos recombinantes para aumentar a especificidade e sensibilidade de testes imunológicos, porém ainda não se tem uma metodologia que solucione as dificuldades do diagnóstico da toxoplasmose. Dessa forma, são necessários estudos que identifiquem biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico da toxoplasmose aguda e congênita, como também possam ser relacionados ao prognóstico de crianças congenitamente infectadas.

Estes biomarcadores poderiam proporcionar um diagnóstico mais rápido e eficaz, essencial para o início de um tratamento adequado, o qual pode reduzir as taxas de transmissão de *T. gondii* ao feto, ou ainda, minimizar os sinais clínicos que aparecem nas fases posteriores ao nascimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

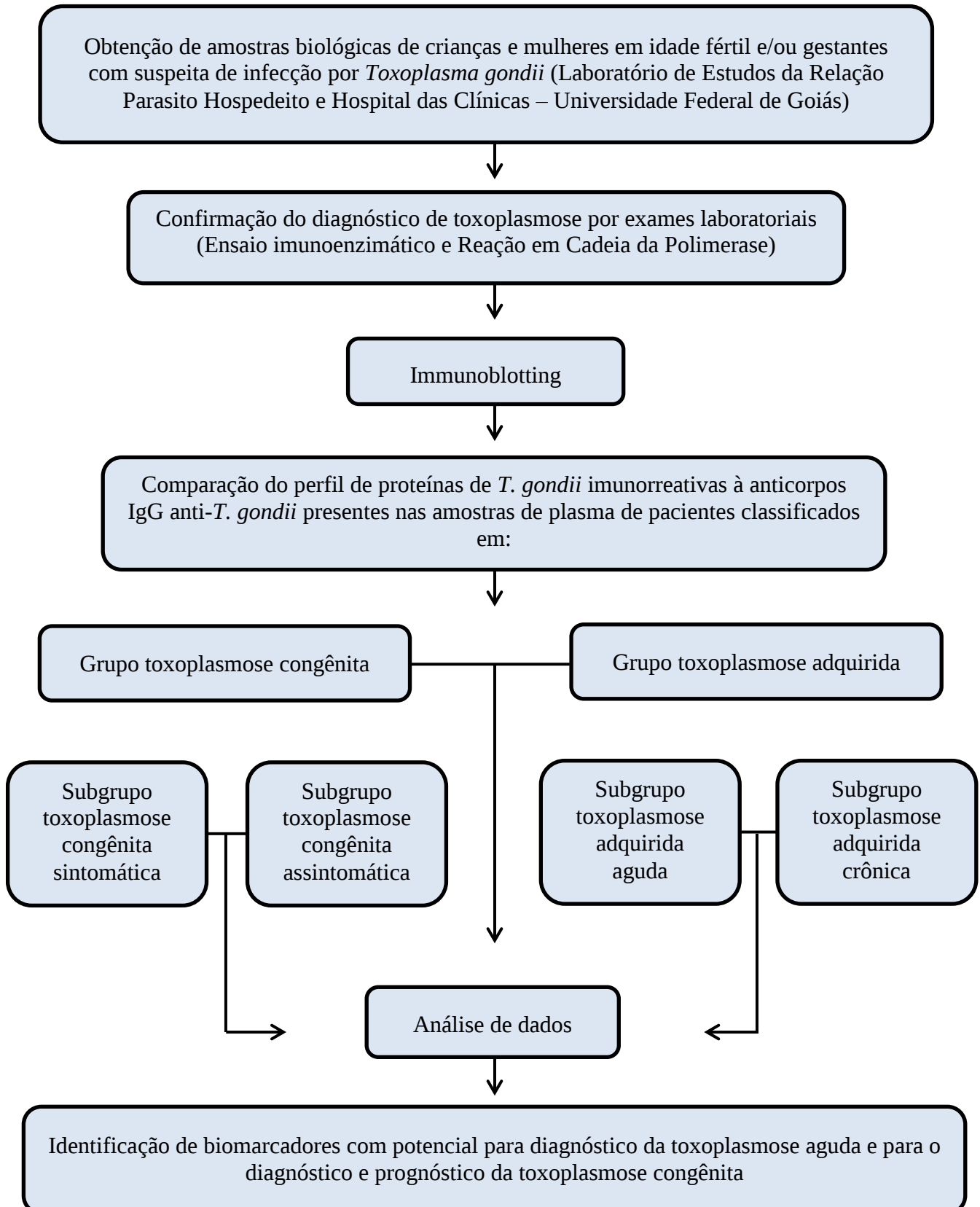
Analisar o perfil de reconhecimento de proteínas de *T. gondii* com potencial para serem biomarcadores para o diagnóstico da toxoplasmose adquirida aguda e para o diagnóstico e prognóstico da toxoplasmose congênita.

3.2. Objetivos específicos

- Identificação de proteínas de *T. gondii* prevalentemente imunoreativas à anticorpos IgG anti-*T.gondii* de crianças com toxoplasmose congênita e de mulheres em idade fértil e/ou gestantes com toxoplasmose adquirida.
- Comparar e analisar o perfil de proteínas de *T. gondii* imunorreativas à anticorpos IgG anti-*T.gondii* de crianças com toxoplasmose congênita e de mulheres em idade fértil e/ou gestantes com toxoplasmose adquirida.
- Comparar e analisar o perfil de proteínas de *T. gondii* imunorreativas à IgG anti-*T.gondii* de crianças com toxoplasmose congênita sintomática e assintomática.
- Comparar e analisar o perfil de proteínas de *T. gondii* imunorreativas à IgG anti-*T.gondii* de mulheres em idade fértil e/ou gestantes com toxoplasmose adquirida aguda e crônica.

4. MÉTODOS

4.1. Fluxograma



4.2. Obtenção de amostras biológicas

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HC/UFG, via Plataforma Brasil. Número do parecer: 2.901.669 em 18 de setembro de 2018.

Este é um estudo de coorte e foi realizado no período de junho de 2016 a agosto de 2020. Foi calculado o poder estatístico de acordo com Murray (2008) para determinação do número de amostras, o qual apresentou valor de 99,73% quando selecionadas 116 amostras de soro de crianças e de mulheres em idade fértil e/ou gestantes.

As amostras foram obtidas pela soroteca do Laboratório de Estudos da Relação Parasito Hospedeiro na Universidade Federal de Goiás (LAERPH – UFG), provenientes de projetos anteriores aprovados pelo comitê de ética. Além disso, durante a execução deste estudo foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com suspeita de toxoplasmose, atendidos nos setores de pediatria e ginecologia/obstetrícia no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG).

Todas as amostras sanguíneas utilizadas neste estudo foram coletadas em tubos BD Vacutainer® com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), os quais foram centrifugados por 10 minutos a 1.500 rpm para separação do plasma. O plasma e a camada leucocitária foram transferidos para eppendorfs distintos adequadamente identificados e armazenados em temperatura a - 20°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas à exames laboratoriais para toxoplasmose (ELISA) e à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do material genético de *T. gondii*.

As amostras dos pacientes foram coletadas após o consentimento dos mesmos ou responsáveis com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3. Exames laboratoriais para o diagnóstico da toxoplasmose

4.3.1. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Todas as amostras de plasma foram submetidas ao teste imunoenzimático com o kit comercial Bioelisa-Bioclin® (Quibasa, Santa Branca, Belo Horizonte, Brasil) e a metodologia foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de plasma dos pacientes foram diluídas na proporção de 1:100 e incubadas em microplacas sensibilizadas com antígenos de *T. gondii*. Posteriormente,

as microplacas foram lavadas e o conjugado foi adicionado, o qual se liga às imunoglobulinas anti-*T.gondii* presentes no plasma dos pacientes. Após uma nova etapa de incubação e lavagem, o substrato cromogênico e a solução bloqueadora foram adicionados, conferindo coloração para as amostras reagentes. Em seguida, as amostras foram submetidas à leitora de microplacas KHB ST-360® para obtenção da absorbância.

4.3.2. Extração de DNA de *Toxoplasma gondii*

A extração de DNA de *T. gondii* foi realizada de acordo com as instruções presentes no Kit comercial Biopur® (Mobius Life Science, Pinhais, Paraná, Brasil). As amostras de sangue periférico (anel leucocitário) foram lisadas através da incubação com uma solução caotrópica na presença de Proteinase K e em seguida a ligação de DNA na membrana sílica dos tubos-filtro foi alcançada pela adição de etanol. Após a lavagem das amostras, o DNA foi ressuspendido em uma solução de eluição e armazenado a - 20°C.

4.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo 10mM TRIS HCl (pH 9,0), 3,5mM MgCl₂, 0,2U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos), 0,5mM de cada desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), 50 pmoles de cada iniciador da reação e 2µl de DNA molde. O programa de amplificação constituído de uma desnaturação inicial a 94°C (5 min), 35 ciclos de desnaturação a 94°C (1 min), anelamento a 62°C (1 min) e extensão a 72°C (1 min) seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos. A sequência de DNA amplificado foi B1 e os pares de primers utilizados foram: Toxo-B5 (5'-TGA AGA GAG GAA ACA GGT GGT CG-3') e Toxo-B6 (5'-CCG CCT CCT TCG TCC GTC GTA-3') (BURG *et al.*, 1989; CRISTINA *et al.*, 1991). O produto da PCR foi analisado em gel de poliacrilamida a 6% e corado por nitrato de prata (SANTOS *et al.*, 1993). Todas as etapas da PCR foram monitoradas com controles negativos (amostra biológica de pacientes com resultados imunológicos negativos para toxoplasmose) e positivos (cepa RH e ME-49), identificados com peso molecular equivalente a 100 pb (DNA Ladder RTU, KASVI®, São José dos Pinhais, Brasil). Cada reação de PCR foi realizada em duplicata e nos casos em que houve discordância dos resultados uma nova reação foi realizada para confirmação.

4.4. Análise de prontuários

Foram analisados prontuários no HC-UFG para obtenção de dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo. Nos casos das mulheres em idade fértil e/ou gestantes, os prontuários foram analisados para confirmação da soroconversão da toxoplasmose e determinação do estado de saúde das pacientes.

As informações clínicas das crianças foram adquiridas pela análise dos resultados de exames oftalmológicos, neurológicos, auditivos e comportamentais.

4.5. Critérios para seleção de amostras biológicas

Os critérios de inclusão para utilização das amostras foram de crianças e de mulheres híginas em idade fértil e/ou gestantes que apresentaram sorologia reagente (IgM e/ou IgG anti-*T. gondii*) para toxoplasmose e/ou presença de DNA do parasito nas amostras biológicas.

Os critérios de exclusão englobaram amostras de pacientes que apresentaram resultados negativos para a infecção e/ou aqueles diagnosticados com doenças autoimunes e HIV. Fatores reumatóides são responsáveis por reações cruzadas e o imunocomprometimento causado pela infecção por HIV pode comprometer o reconhecimento do perfil de proteínas de *T. gondii*.

As amostras biológicas foram selecionadas de acordo com os critérios acima e divididas em dois grupos, cada um composto por dois subgrupos:

1. Grupo toxoplasmose congênita (GTC): amostras de plasma de crianças congenitamente infectadas por *T. gondii* que apresentaram sorologia reagente para IgM e IgG; ou concentração de anticorpos IgG anti-*T. gondii* maior que de suas respectivas mães; ou persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* até o primeiro ano de vida e/ou diagnóstico molecular positivo para toxoplasmose.

1.1 Subgrupo toxoplasmose congênita sintomática (STCS): amostras de plasma de crianças congenitamente infectadas por *T. gondii* que apresentaram manifestações clínicas características da toxoplasmose após o nascimento.

1.2 Subgrupo toxoplasmose congênita assintomática (STCA): amostras de plasma de crianças congenitamente infectadas por *T. gondii* assintomáticas até o momento da coleta sanguínea.

2. Grupo toxoplasmose adquirida (GTA): amostras de plasma de mulheres híginas em idade fértil e/ou gestantes que apresentaram soroconversão (IgM e

IgG ou somente IgG anti-*T. gondii*) e/ou diagnóstico molecular positivo para toxoplasmose.

2.1 Subgrupo toxoplasmose adquirida aguda (STAA): amostras de plasma de mulheres em idade fértil e/ou gestantes com toxoplasmose adquirida que apresentaram sorologia reagente para IgM e IgG anti-*T.gondii*. A maioria das amostras referente a este subgrupo foi coletada em até quatro meses após o diagnóstico de soroconversão, enquanto as demais variaram até seis e sete meses.

2.2 Subgrupo toxoplasmose adquirida crônica (STAC): amostras de plasma de mulheres em idade fértil e/ou gestantes com toxoplasmose adquirida que apresentaram sorologia reagente para IgG anti-*T.gondii*.

4.6. Obtenção e preparação de antígenos brutos de *Toxoplasma gondii*

Para a obtenção de antígenos brutos de *T. gondii* foram utilizados taquizoítos da cepa RH, a qual é mantida rotineiramente no biotério da UFG. Os parasitos foram adquiridos pelo lavado peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c após três dias da infecção com suspensão de 10^5 taquizoítos/mL de salina estéril (CAPOBIANGO *et al.*, 2016).

Em seguida, o lavado peritoneal contendo taquizoítos foi homogeneizado e centrifugado por 20 segundos a 800 rpm para separação das células dos camundongos. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi suspenso em PBS (pH 7,2), homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 2.000 rpm. Subsequentemente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em tampão e centrifugado por 10 minutos a 2.000 rpm, etapa, a qual foi repetida três vezes. O sedimento foi diluído em 1 mL de PBS (pH 7,2) para contagem dos taquizoítos em câmara hemocitométrica (MACHADO *et al.*, 2010).

Posteriormente, o material obtido foi transferido para microtubos de tampa de rosca de 2 mL contendo cristais de vidro e submetidos ao agitador Mini-BeadBeater® (BioSpec Products Inc®, Oklahoma, EUA) por 6 ciclos de 1 min para obtenção de antígeno bruto, composto por antígenos de superfície e citoplasmático, a partir da lise do parasito (HURLEY *et al.*, 1987). A concentração de proteínas presentes no antígeno foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e o antígeno foi armazenado à -20°C para posterior aplicação no gel de eletroforese.

4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferência

A eletroforese (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970), com modificações. Após a elaboração de géis de empilhamento (Tris-HCl 1 M; SDS 10%; pH 6,8) e de separação (Tris-HCl 1,5 M; SDS 10%; pH 8,8) com concentrações de 4% e 12% de poliacrilamida, respectivamente, 30 µg de proteínas de *T. gondii* foram diluídas em tampão de amostra (SDS 2%; glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 60 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,002%) na mesma proporção do volume do antígeno.

Em seguida, as proteínas foram aplicadas em cada poço do gel de poliacrilamida, exceto no primeiro, onde foi inserido o marcador de peso molecular padrão Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad®, California, USA) para estimar as massas moleculares das proteínas de *T. gondii*.

As proteínas foram separadas no gel de poliacrilamida por uma corrente elétrica a 70 Volts e 60 mA em tampão de corrida (Tris-HCl 250 mM; glicina 2,5 M; SDS 1%) por aproximadamente quatro horas no sistema Mini Protean II (Bio-Rad®, Califórnia, EUA) (LAEMMLI, 1970).

A eletrotransferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose de 0.45 µm (Bio-Rad®, Alemanha) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Towbin *et al.* (1979), com modificações. Finalizada a eletroforese, o gel foi mergulhado em tampão de transferência (metanol a 20%; Tris 25mM; glicina 192 mM, pH 8,0) para a montagem da estrutura de imunotransferência a partir do suporte acrílico fornecido pelo kit. O “sanduíche” montado foi colocado e mantido no aparelho de eletrotransferência Minitrans-Blot (Bio-Rad®, Califórnia, EUA) por duas horas a 150 Volts e 150 mA.

Após este período, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução Ponceau-S a 1% em ácido acético a 10% durante 10 minutos, e em seguida descorada em água destilada para confirmação da transferência das proteínas. A membrana foi cortada em fitas de aproximadamente 5 mm de largura e armazenadas em temperatura a -20°C para posterior realização da reação com as amostras dos pacientes (CAPOBIANGO *et al.*, 2016).

4.8. Immunoblotting

A membrana de nitrocelulose foi saturada com leite desnatado em pó (Molico[®]) em TBS-Tween 20 a 5% por duas horas para impedir interações inespecíficas entre as proteínas e os anticorpos presentes nas amostras biológicas dos pacientes (CAPOBIANGO *et al.*, 2016). Em seguida, a fita de nitrocelulose foi incubada por uma hora com o plasma do paciente em uma diluição de 1:100, de acordo com Machado *et al.* (2010). Após três lavagens, de cinco minutos com TBS-Tween, a membrana de nitrocelulose foi incubada com anti-imunoglobulina G humana conjugada com peroxidase (SIGMA[®], St. Louis, EUA), a qual foi diluída a 1:3000 em TBS-Tween 5%. Após agitação mecânica por uma hora, à temperatura ambiente, foi realizado um novo ciclo de lavagem, como mencionado anteriormente (CAPOBIANGO *et al.*, 2016).

A revelação foi realizada com 0,2% de 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB - SIGMA[®], St. Louis, EUA) e peróxido de hidrogênio diluídos em TBS. A tira foi incubada nesta solução por aproximadamente cinco minutos e a reação foi interrompida por lavagem da membrana em água destilada após visualização das proteínas antigênicas (CAPOBIANGO *et al.*, 2016).

4.9. Determinação do perfil antigênico

O perfil de proteínas imunorreativas foi analisado pelo software OriginPro, utilizando uma equação de regressão linear. A partir do marcador de peso molecular padrão Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad[®], California, USA) foi possível determinar as massas moleculares das proteínas, as quais foram reconhecidas por anticorpos IgG anti-*T.gondii*.

4.10. Análise estatística

Para verificar a associação entre as variáveis em estudo foram utilizados os testes de Qui quadrado de Pearson (aplicado a dados categóricos para avaliar quão provável qualquer diferença observada aconteça ao acaso) e Exato de Fisher que testa a hipótese de que duas variáveis, apresentadas em uma tabela 2x2, estão associadas. É indicado quando o tamanho das duas amostras independentes é pequeno e consiste em determinar a probabilidade exata de ocorrência de uma frequência observada.

A medida utilizada foi de *Odds Ratio* (OR) e para todas as análises estatísticas foi considerado um nível de significância de 5%. Ou seja: valores de *P*

menores ou iguais a 0.05 foram considerados como estatisticamente significativos. As análises foram realizadas utilizando o software Stata 14.0.

5. RESULTADOS

5.1. Artigo

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados no artigo “Identification of biomarkers for diagnosis and prognosis of congenital and acute toxoplasmosis”, publicado na revista *The Journal of Infectious Diseases*. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa613>

The Journal of Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



Identification of Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Congenital and Acute Toxoplasmosis

Heloisa Ribeiro Storchilo,¹ Giulianne Monteiro Teixeira,¹ André Luis Elias Moreira,² Taynara Cristina Gomes,¹ Clayton Luiz Borges,² and Ana Maria de Castro¹

¹Department of Parasitology, Laboratório da Relação Parasito-Hospedeiro, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, and ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Background. The diagnosis of congenital toxoplasmosis can be inconclusive in many cases. Despite the several serological tests developed, the literature on biomarkers that can assist in the diagnosis of congenital and acute toxoplasmosis is limited. The objective of this study was to analyze the immunoreactive profile of *Toxoplasma gondii* protein bands with the potential to be biomarkers for diagnosis and prognosis of congenital and acute toxoplasmosis.

Methods. Peripheral blood samples from women of childbearing age and/or pregnant women diagnosed with acquired toxoplasmosis as well as from congenitally infected children were selected and submitted to immunoblotting for analysis of the immunoreactive bands profile by immunoglobulin G (IgG) antibodies.

Results. When comparing the immunoreactive bands profile for antibodies present in samples from different groups and subgroups, the 150, 18.5, and 16.96-kDa bands were more immunoreactive with the antibodies present in serum samples from the acquired infection group. The 343, 189, 150, 75, and 42-kDa bands showed more chance to be detected by the symptomatic congenital infection subgroup samples, while the 61, 50, and 16.96-kDa bands were significantly immunoreactive with the acute infection subgroup samples.

Conclusions. The identification of these potential biomarkers can assist in early diagnosis and treatment of congenital toxoplasmosis.

Keywords. immunoblotting; congenital toxoplasmosis; prognosis.

5.2. Artigos publicados

Os demais artigos publicados durante o período do doutorado estão comprovados no Anexo 4 e serão listados a seguir:

1. REZENDE, H. H. A.; **STORCHILO, H. R.**; LIMA, J. A. S.; GOMES JÚNIOR, A. R.; GOMES, T. C.; SOUZA, J. Y.; AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N. D.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Nursing infant with acquired toxoplasmosis in the first months of life - a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, e63, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759063>
2. AVELAR, J. B.; SILVA, M. G.; REZENDE, H. H. A.; **STORCHILO, H. R.**; AMARAL, W. N.; XAVIER, I. R.; AVELINO, M. M.; CASTRO, A. M. Epidemiological factors associated women treated in the public healthcare system of Goiânia, State of Goiás, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.51, n. 1, p. 57-62, 2018. DOI: 10.1590/0037-8682-0112-2017
3. **STORCHILO, H. R.**; REZENDE, H. H. A.; GOMES, T. C.; SOUZA, J. Y.; JUNIOR, A. R. G.; AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N.; CASTRO, A. M. Basic hell prick test: inclusion of screening, diagnosis and criteria for early confirmation of congenital infection by *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, p. e30, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1590/S1678-9946201961030>
4. REZENDE, H. H. A.; **STORCHILO, H. R.**; AVELAR, J. B.; SILVEIRA, M. B.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em gatos errantes (*Felis catus domesticus*) em Goiânia, Goiás, Brasil. **Multi-Science Journal**, v. 2, n.1, p. 86-88, 2019.
5. REZENDE, H. H. A.; LIMA, J. A. S.; JUNIOR, A. R. G.; MELO, J. O.; **STORCHILO, H. R.**; GOMES, T. C.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Detection of DNA and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in errant cats (*Felis*

catus domesticus, linnaeus, 1758) captured by the zoonoses control center of Goiânia, state of Goiás, Brazil. **Revista de Biologia Neotropical / Journal of Neotropical Biology**, v. 16, n. 2, p. 84-88, 2019.

6. PERIM, L. V.; CUSTÓDIO, N. C. C.; LIMA, V. C. V.; IGREJA, J. A. S. L.; ALVES, D. S. M. M.; **STORCHILO, H. R.**; JÚNIOR, A. R. G.; CASTRO, A. M.; COSTA, W. L. G. and REZENDE, H. H. A. Occurrence of parasites in salads in restaurants in Aparecida de Goiânia, Goiás, Brazil. **Journal of Tropical Pathology**, v. 49, n.3, p. 207-214, 2020.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos foi possível identificar potenciais biomarcadores para o diagnóstico da toxoplasmose adquirida (150, 18.5 e 16.96 kDa), para o prognóstico da toxoplasmose congênita (343, 189, 150, 75 e 42 kDa) e para o diagnóstico da toxoplasmose aguda (61, 50 e 16.96 kDa). Uma metodologia padronizada utilizando estes biomarcadores, em conjunto com os demais exames laboratoriais, podem auxiliar em um diagnóstico e tratamento precoce nos casos inconclusivos da infecção. Assim, as taxas de transmissão de *T. gondii* ao feto e o aparecimento de manifestações clínicas no decorrer da vida de crianças congenitamente infectadas podem ser reduzidos ou evitados.

7. PERSPECTIVAS

Salientamos a necessidade da identificação das proteínas de interesse para a obtenção de resultados mais precisos e que futuramente possam ser aplicados em ensaios sorológicos. Dessa forma, experimentos paralelos aos objetivos propostos nesta tese estão sendo realizados por meio da técnica de imunoprecipitação, resultados que serão apresentados em um segundo artigo.

Esta metodologia não foi incluída na tese, pois está em fase de padronização. O atraso da realização dos experimentos ocorreu devido a problemas com a manutenção do equipamento de espectrometria de massas e o cenário atual de pandemia causado pelo coronavírus.

REFERÊNCIAS

ACHAR, I. G.; VATTEONE, C. G.; GUILLÉN, I. A.; CARPINELLI, M. M.; MEZA, T.; ARIA, L.; ROJAS, A.; INFAZÓN, B.; ACOSTA, M. E. Perfil antigénico en fase aguda y crónica de toxoplasmosis en embarazadas por la técnica de Western Blot. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 16, n. 3, p. 35-43, 2018.

ALMEIDA, M. J.; DE OLIVEIRA, L. H. H.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. Aspectos sociopolíticos da epidemia de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí (PR). **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, p. 1363-73, 2011.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; TERRONES-SALDÍVAR, M. C.; HERNÁNDEZ-TINOCO, J.; MUÑOZ-TERRONES, M. D.; GALLEGOS-GONZÁLEZ, R. O.; SÁNCHEZ-ANGUIANO, L. F.; REYES-ROBLES, M. E.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; LIESENFELD, O.; ESTRADA-MARTÍNEZ, S. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in pregnant women in Aguascalientes City, Mexico: a cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 6, n. 7, 2016.

ANDRADE, G. M. Q; VASCONCELOS-SANTOS, D. V; CARELLOS E. V. M; ROMANELLI, R. M; VITOR, R. W; CARNEIRO, A. C, JANUARIO, J. N. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochroiditis during pregnancy. **Jornal de pediatria**, v. 86, n. 1, p. 85-88, 2010.

ARAB-MAZAR, Z.; FALLAHI, S.; KOOCHAKI, A.; HAGHIGHI, A.; SEYYED TABAEI, S. J. Immunodiagnosis and molecular validation of *Toxoplasma gondii*-recombinant dense granular (GRA) 7 protein for the detection of toxoplasmosis in patients with cancer. **Microbiological Research**, v. 183, p. 53-59, fev. 2016.

ASHBURN, D.; JOSS, A. W.; PENNINGTON, T. H.; HO-YEN, D. O. Specificity and usefulness of an IgE immunosorbent agglutination assay for toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48, n. 1, p. 64–69, jan. 1995.

ATKINSON, A. J.; COLBURN, W. A.; DEGRUTTOLA, V. G.; DEMETS, D. L.; DOWNING, G. J.; HOTH, D. F.; OATES, J. A.; PECK, C. C.; SCHOOLEY, R. T.;

SPIPKER, B. A.; WOODCOCK, J.; ZEGER, S. L. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clin Pharmacol Therapeutics**, v. 69, p. 89-95, 2001.

AVELAR, J. B.; REZENDE, H. H. À.; STORCHILO, H. R.; CANDIDO, R. R. L.; AMARAL, W. N.; AVELINO, M. M.; CASTRO, A. M. Reativação da toxoplasmose durante o oitavo mês de gestação. **Renome**, v. 4, p. 57-69, 2015.

AVELAR, J. B.; SILVA, M. G.; REZENDE, H. H. A.; STORCHILO, H. R.; AMARAL, W. N.; XAVIER, I. R.; AVELINO, M. M.; CASTRO, A. M. Epidemiological factors associated women treated in the public healthcare system of Goiânia, State of Goiás, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.51, n. 1, p. 57-62, 2018.

AVELAR, M. V.; MARTINEZ, V. O.; MOURA, D. L.; BARROS, I. A.; PRIMO, A. A. S.; DUARTE, A. O.; SOARES, N. M.; LIMA, F. W. M. Association between seroprevalence of IgG anti-*Toxoplasma gondii* and risk factors for infection among pregnant women in Climério de Oliveira Maternity, Salvador, Bahia, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2017. ISSN 1678-9946 versão online. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003646652017005000254&lng=en&tlng=en. Acesso em: 5 set. 2019.

AVELINO, M. M.; CAMPOS, D. J.; CARMO BARBOSA PARADA, J.; CASTRO, A. M. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 108, n. 1, p. 19-24, mai. 2003.

AYI, I; EDU, A. S; APEA-KUBI, K. A; BOAMAH, D; BOSOMPEM, K. M; EDOH, D. Sero-epidemiology of toxoplasmosis amongst pregnant women in the greater accra regions of Ghana. **Ghana Medical Journal**, v. 43, n. 3, 2009.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 12, p. 1625–1633, jun. 2002.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426–430, 2003.

BECKERS, C. J.; DUBREMETZ, J. F.; MERCEREAU-PUJALON, O.; JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. **Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 4, p. 947-961, 1994.

BEGHETTO, E.; BUFFOLANO, W.; SPADONI, A.; DEL PEZZO, M.; DI CRISTINA, M.; MINENKOVA, O. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p. 5414-5418.

BELLANTI, J. A.; PUNG, Y. G.; ZELIGS, B. J. Imunologia. In: AVERY, G. B., FLETCHER, M. A.; MACDONALD, M. G.; **Neonatologia, Fisiologia e Tratamento do Recém-nascido**. 4. ed. Rio de Janeiro: Medsi. p. 1003-1005, 1999.

BELLI, S. I.; SMITH, N. C.; FERGUSON, D. J. The coccidian oocyst: A tough nut to crack! **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 416-423, set. 2006.

BELLUCO, S.; MANCIN, M.; CONFICONI, D.; SIMONATO, G.; PIETROBELLI, M.; RICCI, A. Investigating the determinants of *Toxoplasma gondii* prevalence in meat: a systematic review and meta-regression. **PLoS One**, v.11, p. e0153856, 2016.

BELLUCO, S.; PATUZZI, I.; RICCI, A. Bovine meat versus pork in *Toxoplasma gondii* transmission in Italy: A quantitative risk assessment model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 269, p. 1-11, mar. 2018.

BERAN, O.; KODYM, P.; MALY, M.; DAVIDOVA, A., REINVARTOVA, G.; JILICH, D.; HOLUB, M.; ROZSYPAL, H. The Effect of Latent *Toxoplasma gondii* Infection on the Immune Response in HIV-Infected Patients. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 271842, 2015.

BERKELMAN; STENSTED. Two-dimensional eletrophoresis using immobilized pH gradientes: principles and methods. Edition AC. Uppsala, Sweden: Amersham **Biosciences Inc**, p. 100, 1998.

BEZERRA-JÚNIOR, R. Q.; MARTINS, G. R.; BARROSO, I. C.; MARINHO, R. C.; AGUIAR, T. D. A. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 100-112, 2013.

BISCHOFF, A. R.; FRIEDRICH, L.; CATTAN, J. M.; UBERTI, F. A. Incidence of symptomatic congenital toxoplasmosis during ten years in a brazilian hospital. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 12, p. 1313-1316, 2016.

BISHOP, J. R.; CRAWFORD, B. E.; ESKO, J. D. Cell surface heparan sulfate promotes replication of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5395–5401, 2005.

BLADER, I.; COLEMAN, B.; CHEN, C. T.; GUBBELS, M. J. The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 463-485, 2015.

Bóia, M. N.; Carvalho-Costa, F. A.; Sodré, F. C.; Pinto, G. M.; Amendoeira, M. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 17-20, 2008.

BOLLANI, L; STROCCHIO, L; STRONATI, M. Congenital toxoplasmosis. **Early Human Development**, v. 89, p. 70-72, 2013.

BORKAKOTY, B.; BISWAS, D.; JAKHARIA A.; MAHANTA, J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among pregnant women in northeast India. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 64, n. 10, p. 24-28, 2016.

BOUGHATTAS, S; BEN-ABDALLAH, R; SIALA, E; SOUISSI, O; MAATOUG, R; AOOUN, K; BOURATBINE, A. Case of fatal congenital toxoplasmosis associated with I/III recombinant genotype. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 3, p. 615-619, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRADLEY, P. J.; WARD, C.; CHENG, S. J.; ALEXANDER, D. L.; COLLIER, S.; COOMBS, G. H.; DUNN, J. D.; FERGUSON, D. J.; SANDERSON, S. J.; WASTLING, J. M.; BOOTHROYD, J. C. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 34245–34258, 2005.

BROSSIER, F.; JEWETT, T. J.; SIBLEY, L. D.; URBAN, S. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 4146–4151, 2005.

BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1787-1792, 1989.

BURRELLS, A.; OPSTEEGH, M.; POLLOCK, K. G.; ALEXANDER, C. L.; CHATTERTON, J.; EVANS, R.; WALKER, R.; MCKENZIE, C. A.; HILL, D.; INNES, E. A.; KATZER, F. The prevalence and genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* from individuals in Scotland, 2006-2012. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 324-336, jun. 2016.

CÂMARA, J. T; SILVA, M. G. da; CASTRO, A. M. de. Prevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas em dois centros de referência em uma cidade do Nordeste, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 2, p. 64-70, 2015.

CAMARGO, M. E. TOXOPLASMOSE. IN: FERREIRA, A. W; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro p. 278-286, 2001.

CAMEJO, A.; GOLD, D. A.; LU, D.; MCFETRIDGE, K.; JULIEN, L.; YANG, N.; JENSEN, K. D. C.; SAEIJ, J. P. J. Jeroen P. J. Identification of three novel

Toxoplasma gondii rhoptry proteins. **International Journal Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 147-160, fev. 2014.

CAPOBIANGO, J. D.; MONICA, T. C.; FERREIRA, F. P.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L.; REICHE, E. M. Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 6, p. 616-623, nov. 2016.

CAPRETTI, M. G.; DE ANGELIS, M.; TRIPADALLI, E.; ORLANDI, A.; MARANGONI, A.; MORONI, A.; GUERRA, B.; ARCURI, S.; MARSICO, C.; FALDELLA, G. Toxoplasmosis in pregnancy in an area with low seroprevalence: is prenatal screening still worthwhile? **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 1, p. 5-10, jan. 2014

CARELLOS, E. V. M; ANDRADE, G. M. Q. de; AGUIAR, R. A. L. Pessoa de. Avaliação da aplicação do protocolo de triagem pré-natal para toxoplasmose em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: estudo transversal em puérperas de duas maternidades. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 391-401, 2008.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 111-122, fev. 2002.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, n. 2, p. 114–123, jun. 1997.

CENCI-GOGA, B. T.; ROSSITTO, P. V.; SECHI, P.; MCCRINDLE, C. M.; CULLOR, J. S. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 7, p. 751-762, jul. 2011.

CÉRÈDE, O.; DUBREMETZ, J. F.; BOUT, D.; LEBRUN, M. The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 11, p. 2526-2536, jun. 2002.

CESBRON-DELAUW, M. F.; CAPRON, A. Excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* their origin and role in the host-parasite interaction. **Research in Immunology**, v. 144, n. 1, p. 41-44, 1993.

CESBRON-DELAUW M. F.; GENDRIN, C.; TRAVIER, L.; RUFFIOT, P.; MERCIER, C. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. **Traffic**, v. 9, n. 5, p. 657–664, 2008.

CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, S.; BEAUCHAMPS, P.; FOURMAUX, M. P.; CAMUS, D.; CAPRON, A.; DUBREMETZ, J. F. Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 23, p. 16217–16222, jun. 1994.

CHA, D. Y.; SONG, I. K.; LEE, G. S.; HWANG, O. S.; NOH, S. D.; SHIN, D. W.; LEE, Y. H. Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 39, n 3, p. 233-240, set. 2001.

CHING, X. T.; LAU, Y. L.; FONG, M. Y.; NISSAPATORN, V.; ANDIAPPAN, H. Recombinant dense granular protein (GRA5) for detection of human toxoplasmosis by Western blot. **BioMed Research International**, v. 2014; 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/690529/abs>. Acesso em: 05 set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/690529>.

CORTINA-BORJA, M.; TAN, H. K.; WALLON, M.; PAUL, M.; PRUSA, A.; BUFFOLANO, W.; MALM, G.; SALT, M.; FREEMAN, K.; PETERSEN, E.; GILBERT, R. E. Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 10, p. e1000351 out. 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1000351> Acesso em: 05 set. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000351>

COSTA, J. G. L. **Diagnóstico e quantificação de *Toxoplasma gondii* através de PCR em tempo real em sangue periférico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

COSTA, J. G. L.; TAVARES, A. T.; SILVA, D. R. C.; PINTO, L. V.; BARAVIERA, R. C. A.; NOVIELLO, M. L. M.; ARANTES, R. M. E.; VITOR, R.

W. A. Kinetics of parasite distribution after reinfection with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 184, p. 22-30, jan. 2018.

COSTA, J. G.; PERETTI, L. E.; GARCÍA, V. S.; PEVERENGO, L.; GONZÁLEZ, V. D.; GUGLIOTTA, L. M.; DALLA FONTANA, M. L.; LAGIER, C. M.; MARCIPAR, I. S. P35 and P22 *Toxoplasma gondii* antigens abbreviate regions to diagnose acquired toxoplasmosis during pregnancy: toward single-sample assays. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, n. 4, p. 595-604, mar. 2017.

CRISTINA, N.; LIAUD, M. F.; SANTORO, F.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. **Experimental Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 73-81, jul. 1991.

DA SILVA, M. G.; VINAUD, M. C.; DE CASTRO, A. M.. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0141700, 2015.

DARD, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; PELLOUX, H. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 492-506, jun. 2016.

DARYANI, A.; SHARIF, M.; KALANI, H.; RAFIEI, A.; KALANI, F.; AHMADPOUR, E. Electrophoretic Patterns of *Toxoplasma gondii* Excreted/Secreted Antigens and Their Role in Induction of the Humoral Immune Response. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 4, p. e9525, abr. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4138627/> . Acesso em: 05 set. 2019. DOI: 10.5812/jjm.9525.

DE MARCO, R.; CECCARELLI, R.; FRULIO, R.; PALMERO, C.; VITTONE, P. Retinochoroiditis associated with congenital toxoplasmosis in children: IgG antibody profiles demonstrating the synthesis of local antibodies. **European Journal of Ophthalmology**, v. 13, n. 1, p. 74-79, jan. 2003.

DE OLIVEIRA, G. B.; DA SILVA, M. A.; WANDERLEY, L. B.; DA CUNHA, C. C.; FERREIRA, E. C.; DE MEDEIROS, Z. M.; FILHO, J. L.; DE MELO, F. L.; DE ARAÚJO, P. S.; SANTOS, A. H. Cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome in the neurological emergency department of a tertiary hospital. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 150, p. 23-6, nov. 2016.

DELAIR, E.; MONNET, D.; GRABAR, S.; DUPOUY-CAMET, J.; YERA, H.; BRÉZIN, A. P. Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 146, n. 6, p. 851-855, dez. 2008.

DELHAES, L.; AJZENBERG, D.; SICOT, B.; BOURGEOT, P.; DARDÉ, M. L.; DEI-CAS, E.; HOUFFLIN-DEBARGE, V. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. **Prenatal Diagnosis**, v. 30, n. 9, p. 902-905, set. 2010.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, jul. 1998.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 4, p. 862-865, ago. 1998.

DUBEY, J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 215-219, fev. 2001.

DUBEY, J. P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 713-717, ago. 2002.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 60-73, fev. 2010.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, abr. 1998.

DUNAY, I. R.; DAMATTA, R. A.; FUX, B.; PRESTI, R.; GRECO, S.; COLONNA, M.; SIBLEY, L. D. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 29, n. 2, p. 306–317, ago. 2008.

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 461-466, ago. 2010.

DUPONT, C. D; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 793–813, nov. 2012.

DZIERSZINSKI, F.; PEPPER, M.; STUMHOFER, J. S.; LAROSA, D. F.; WILSON, E. H.; TURKA, L. A.; HALONEN, S. K.; HUNTER, C. A.; ROSS, D. S. Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 11, p. 5200–5209, nov. 2007.

EL DEEB, H. K. E; SALAH-ELDINB, H; KHODEER, S; ALLAH, A. A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in antenatal population in Menoufia governorate, Egypt. **Acta tropica**, v. 124, n. 3, p. 185-191, 2012.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection and review. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 2, p. 280-285, jan. 2009.

EMELIA, O.; RAHANA, A. R.; MOHAMAD FIRDAUS, A.; CHENG, H. S.; NURSYAIRAH, M. S.; FATINAH, A. S.; AZMAWATI, M. N.; AISAH, M. Y. IgG avidity assay: a tool for excluding acute toxoplasmosis in prolonged IgM titer sera from pregnant women. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 633-640, dez. 2014.

ETHERIDGE, R. D.; ALAGANAN, A.; TANG, K.; LOU, H. J.; TURK, B. E.; SIBLEY, L. D. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18

and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 5, p. 537–550, mai. 2014

FANG, R.; FENG, H.; HU, M.; KHAN, M. K.; WANG, L.; ZHOU, Y.; ZHAO, J. Evaluation of immune responses induced by SAG1 and MIC3 vaccine cocktails against *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1, p. 140-146, jun. 2012.

FENTA, D. A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among pregnant women attending antenatal clinics at Hawassa University comprehensive specialized and Yirgalem General Hospitals, in Southern Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v.19, p. 1056, 2019.

FEREZIN, R. I; BERTOLINI, D. A; DEMARCHI, I. G. Prevalência de sorologia positiva para HIV, hepatite B, toxoplasmose e rubéola em gestantes do noroeste paranaense. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 2, p. 66-70, 2013.

FIGUEIRO-FILHO, E. A; SENEFONTE, F. R; LOPES, A. H. A; MORAIS, O. O; SOUZA, J. V. G; MAIA, T. L; DUARTE, G. Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 181-187, 2007.

FINDAL, G.; BARLINN, R.; SANDVEN, I.; STRAY-PEDERSEN, B.; NORDBO, S. A.; SAMDAL, H. H.; VAINIO, K.; DUDMAN, S. G.; JENUM, P. A. *Toxoplasma* prevalence among pregnant women in Norway: a cross-sectional study. **Acta Pathologica Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 123, n. 4, p. 321-325, abr. 2015.

FLATT, A; SHETTY, N. Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis among antenatal women in London: a re-examination of risk in na ethnically diverse population. **The European Journal of Public Health**, v. 23, n. 4, p. 648-652, 2012.

FRENKEL J. K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology today**, v. 4, n.10, p. 273-278, out. 1988.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

GALVAN-RAMIREZ, M. L.; TROYO, R.; ROMAN, S.; CALVILLO-SANCHEZ, C.; BERNAL-REDONDO, R. A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 271, 2012.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. e6, 2013.

GARWEG JG. Ocular Toxoplasmosis: An Update. **Klin Monbl Augenheilkd**, v. 233, p. 534-539, 2016.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii*. **Journal of immunology**, v. 146, n. 1, p. 286–292, jan. 1991.

GHOSH, R.; GILDA, J. E.; GOMES, A. V. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. **Expert Review of Proteomics**, v. 11, n. 5, p. 549-560, out. 2014.

GILBERT, R. E.; FREEMAN, K.; LAGO, E. G.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; TAN, H. K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M. R.; PETERSEN, E. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. 277, ago. 2008.

GOYETTE, S.; CAO, Z.; LIBMAN, M.; NDAO, M.; WARD, B. J. Seroprevalence of parasitic zoonoses and their relationship with social factors among the Canadian Inuit in Arctic regions. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.78, n. 4, p. 404-410, abr. 2014.

GRZYBOWSKI, M. M.; DZIADEK, B.; DZIADEK, J.; GATKOWSKA, J.; DZITKO, K.; DŁUGOŃSKA, H. *Toxoplasma gondii*: cloning, expression and

immunoreactivity of recombinant ROP5 and ROP18 antigens. **Experimental Parasitology**, v. 150, p.1-6, mar. 2015.

GUIGUE, N.; LÉON, L.; HAMANE, S.; GITS MUSELLI, M.; LE STRAT, Y.; ALANIO, A.; BRETAGNE, S. Continuous Decline of *Toxoplasma gondii* Seroprevalence in Hospital: A 1997-2014 Longitudinal Study in Paris, France. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2369, p. 2369, out. 2018.

GUIMARÃES, A. C. S.; KAWARABAYASHI, M.; BORGES, M. M.; TOLEZANO, J. E.; ANDRADE, J. R. H. F. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 6, p. 479-483, 1993.

GUO, M.; BUCHANAN, R. L.; DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; LAMBERTINI, E.; YING, Y.; GAMBLE, H. R.; JONES, J. L.; PRADHAN, A. K. Qualitative assessment for *Toxoplasma gondii* exposure risk associated with meat products in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 12, p. 2207-2219, dez. 2015.

GUO, M.; LAMBERTINI, E.; BUCHANAN, R. L.; DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; GAMBLE, H. R.; JONES, J. L.; PRADHAN, A. K. Quantifying the risk of human *Toxoplasma gondii* infection due to consumption of fresh pork in the United States. **Food Control**, v. 73, p. 1210-1222, mar. 2017.

GUY, E. C. Toxoplasmosis. **Medicine**, v. 42, n. 1, 2014.

HADFIELD, S. J.; GUY, E. C. Toxoplasmosis. **Medicine**, v. 45, n. 12, p. 763-766, dez. 2017.

HALLUR, V; SEHGAL, R; KHURANA, S. Development of touch down-multiplex PCR for the diagnosis of toxoplasmosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 271, 2015.

HALONEN, S. K.; WEISS, L. M. Toxoplasmose. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, n. 8, p. 125-145, set. 2013.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. A. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 8, p. 576-596, 1995.

HILL, D.; DUBEY J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n.10, p. 634-640, 2002.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* as a parasite in food: analysis and control. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 2016.

HOLEC-GASIOR, L. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 9, p. 1343–1351, 2013.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of infectious diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

HO-YEN, D. O. Toxoplasmosis. **Medicine**, v. 37, p. 12, 2009.

HSIAO, C. H. C., LUISA HILLER, N.; HALDAR, K.; KNOLL, L. J. A HT/PEXEL motif in *Toxoplasma* dense granule proteins is a signal for protein cleavage but not export into the host cell. **Traffic**, v. 14, n. 5, p. 519–531, 2013.

HURLEY, S. S.; SPLITTER, G. A., WELCH, R. A. Rapid lysis technique for mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 2227-2229, nov. 1987.

HUYNH, M. H.; RABENAU, K. E.; HARPER, J. M.; BEATTY, W. L.; SIBLEY, L. D.; CARRUTHERS, V. B. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 9, p 2082-2090, 2003.

IDDAWELA, D.; EHAMBARAM, K.; KUMARASIRI, P. V. R.; WIJESUNDERA, S. Development and validation of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test for the diagnosis of toxoplasmosis in Sri Lanka. **Ceylon Medical Journal**, v. 60, n. 3, set. 2015.

INAGAKI, A. D. M., CARDOSO, N. P.; LOPES, R. J. P. L.; ALVES, L. A. B.; MESQUITA, J. R. F.; ARAÚJO, K. C. G. M.; KATAGIRI, S. Spatial distribution of anti-*Toxoplasma* antibodies in pregnant women from Aracaju, Sergipe, Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 12, p. 535-540, dez. 2014.

JACQUET, A.; COULON, L.; DE NÈVE, J.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; BOLLEN, A.; JURADO, M.; BIEMANS, R. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 35–44, 2001.

JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lútea in eye of normal dimensions and in microphthalmic eye, with parasites in retina. **Casopis Lekarů Ceskyh**, v. 62, p.1021-143, 1923.

JIANG, Ruo-Lan *et al.* Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* among Manchu pregnant women in northeastern China. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 398-401, out. 2018.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; ELDER, S.; RIVERA, H. N.; PRESS, C.; MONTOYA, J. G.; MCQUILLAN, G. M. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States, 2011-2014. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 551-7, 2018.

JONES, J. L.; ROBERTS, J. M. Toxoplasmosis hospitalizations in the United States, 2008, and trends, 1993–2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 7, p. 58–61, 2012.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M.; MCQUILLAN, G.; NAVIN, T.; MCAULEY, J. B. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, n. 4, p. 357-365, 2001.

JONES, J.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. **American Family Physician**, v. 67, n. 10, p. 2131-2138, 2003.

JONES, L. A.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C. W. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 12, p. 635-42, 2006.

KANG, H.; SUZUKI, Y. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. **Infection and immunity**, v. 69, n. 5, p. 2920-2927, 2001.

KAZEMI, B.; MAGHEN, L.; BANDEHPOUR, M.; SHAHABI, S.; HAGHIGHI, A. Gene cloning of P43 surface protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoite and bradyzoite (SAG3) Res J Microbiol, v. 2, p. 170-174, 2007.

KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645–655, 2011.

KHANALIHA, K.; MOTAZEDIAN, M. H.; KAZEMI, B.; SHAHRIARI, B.; BANDEHPOUR, M.; SHARIFNIYA, Z. Evaluation of recombinant SAG1, SAG2, and SAG3 antigens for serodiagnosis of toxoplasmosis. **Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 2, p. 137-42, 2014.

KRUSOR, C.; WOUTRINA, A.; SMITH, M.; TINKER, T.; SILVER, M.; CONRAD; P. A.; SHAPIRO, K. Concentration and retention of *Toxoplasma gondii* oocysts by marine snails demonstrate a novel mechanism for transmission of terrestrial zoonotic pathogens in coastal ecosystems. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4527-4537, nov. 2015.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES DP, MELO AL, GENARO O, LINARDI PM. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAFEVERS, K. A.; NOGUERAS, K. M. M.; COPPENS I.; MORENO, S. N. J.; ARRIZABALAGA, G. A novel dense granule protein, GRA41, regulates timing of egress and calcium sensitivity in *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 9, e12749, set. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cmi.12749>. Acesso em: 05 set. 2019. Epub 24 abr. 2017. <https://doi.org/10.1111/cmi.12749>.

LAGO, E. G.; OLIVEIRA, A. P.; BENDER, A. L. Presence and duration of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 4, p. 363-369, 2014.

LAGO, E. G; CARVALHO, R. L; JUNGBLUT, R; SILVA, V. B; FIORI, R. M. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturiente women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. **Scientia Medica**, v. 19, n. 1, p. 2, 2009

LAI, M. Y.; LAU, Y. L. Screening and identification of host proteins interacting with *Toxoplasma gondii* SAG2 by yeast two-hybrid assay. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 456, 2017.

LAMARQUE, M. H.; PAPOIN, J.; FINIZIO, A. L.; LENTINI, G.; PFAFF, A. W.; CANDOLFI, E.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Identification of a New Rhoptry Neck Complex RON9/RON10 in the Apicomplexa Parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS ONE**, v. 7, e32457, mar. 2012.

LAMARQUE, M. H.; ROQUES, M.; KONG-HAP, M.; TONKIN, M. L.; RUGARABAMU, G.; MARQ, J. B.; PENARETE-VARGAS, D. M.; BOULANGER, M. J.; SOLDATI-FAVRE, D.; LEBRUN, M. Plasticity and redundancy among AMA-RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma* parasites. **Nature Communications**, v. 5, p.4098, 2014.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Experimental Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 89-96, 2000.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1285-1295, out. 2001.

LUO, J.; WANB, J.; TANG, Z.; SHEN, S. Identification of novel antigens for serum IgG diagnosis of human toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 204, 2019.

MACHADO, A. S.; ANDRADE, G. M.; JANUÁRIO, J. N.; FERNANDES M. D.; CARNEIRO, A. C.; CARNEIRO, M.; CARELLOS, E. V.; ROMANELLI, R. M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; VITOR, R. W. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 757-761, set. 2010.

MACHADO, A. V.; CAETANO, B. C.; BARBOSA, R. P.; SALGADO, A. P. C.; RABELO, R. H.; GARCIA, C. C.; BRUNA-ROMERO, O.; ESCRIOU, N.; GAZZINELLI, R. T. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3247-3256, 2010.

MAENZ, M.; SCHLÜTER, D.; LIESENFELD, O.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 39, p. 77–106, 2014.

MALDONADO, Y. A.; READ, J. S. Diagnosis, treatment, and prevention of congenital toxoplasmosis in the United States. **Pediatrics**, v. 139, n. 2, p. e20163860, 2017.

MASATANI, T.; MATSUO, T.; TANAKA, T.; TERKAWI, M. A.; LEE, E. G.; GOO, Y. K.; ABOGE, G. O.; YAMAGISHI, J.; HAYASHI, K.; KAMEYAMA, K.; CAO, S.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. TgGRA23, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the parasitophorous vacuole membrane and intravacuolar network. **Parasitology international**, v. 62, n. 4, p. 372-379, 2013.

MATTOS, C. C. B; SPEGIORIN, L. C. J. F; MEIRA, C. S; SILVA, T. C; FERREIRA, A. I. C; NAKASHIMA, F; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L; MATTOS, L. C. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn

infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 129, n. 4, p. 261-266, 2011.

MAREZE, M.; BENITEZ, A. N.; BRANDÃO, A. P. D.; PINTO-FERREIRA, F.; MIURA, A. C.; MARTINS, F. D. C.; CALDART, E. T.; BIONDO, A. W.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. **PLoS One**, v.14, n. 2, p. e0212375, 2019.

MCAULEY, J. B. Congenital toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. suppl_1, p. S30-S35, 2014.

MCCAUGHEY, C.; WATT, A. P.; MCCAUGHEY, K. A.; FEENEY, M. A.; COYLE, P. V.; CHRISTIE, S. N. *Toxoplasma* seroprevalance in northern ireland. **Ulster Medical Journal**, v. 86, n. 1, p. 43-44, 2017.

MCLEOD, R.; BOYER, K.; KARRISON, T.; KASZA, K.; SWISHER, C.; ROIZEN, N.; JALBRZIKOWSKI, J.; REMINGTON, J.; HEYDEMANN, P. A.; NOBLE, G.; METS, M.; HOLFELS, E.; WITHERS, S.; LATKANY, P.; MEIER, P.; TOXOPLASMOSIS STUDY GROUP. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981–2004: the national collaborative Chicago-based, congenital toxoplasmosis study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 1383-1394, 2006.

MEISSNER, M.; REISS, M.; VIEBIG, N.; CARRUTHERS, V. B.; TOURSEL, C.; TOMAVO, S.; AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 3, p. 563-574, 2002.

MERCIER, C.; DELAUW, M. F. Safe living within a parasitophorous vacuole: the recipe of success by *Toxoplasma gondii*. In: GHIGO, E.; MOTTOLA, G.; MEGE, J. L. **Pathogen Interaction. At the Frontier of Cellular Microbiology**. Kerala, India: Transworld Research Network, 2012. p. 217-250.

MEVELEC, M. N.; MERCEREAU-PUJALON, O.; BUZONI-GATEL, D.; BOURGUIN, I.; CHARDES, T.; DUBREMETZ, J. F.; BOUT, D. Mapping of B epitopes in GRA4, a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* and protection

studies using recombinant proteins administered by the oral route. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 4, p. 183–195, abr. 1998.

MILLER, S. A.; BINDER, E. M.; BLACKMAN, M. J.; CARRUTHERS, V. B.; KIM, K. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 45341-45348, nov. 2001.

MIZANI, A.; ALIPOUR, A.; SHARIF, M.; SARVI, S.; AMOUEI, A.; SHOKRI, A.; RAHIMI, M. T.; HOSSEINI, S. A.; DARYANI, A. Toxoplasmosis seroprevalence in Iranian women and risk factors of the disease: a systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and Health**, v. 45, n. 7, abr. 2017.

MONCADA, P. A.; MONTOYA, J. G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 107, p. 815, 2012.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. Supplement_1, p. S73-S82, 2002.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 12 jun. 2004.

MOSMANN, T. R. Cytokines: is there biological meaning? *Current Opinion in Immunology*, v. 3, n. 3, p. 311-314, 1991.

MOSTAFAVI, S. N.; ATAIEI, B.; NOKHODIAN, Z.; YARAN, M.; BABAK, A. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in Isfahan province, central Iran: a population based study. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 16, n. 4, p. 496–501, 2011.

MURAD, A. M.; SOUZA, G. H. M. F.; GARCIA, J. S.; RECH, E. L. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant derived complex mixtures using nanoUPLC-MSE. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 9, p. 2618–2630, 2011.

MURAT, J. B.; FRICKER HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; PELLOUX, H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 9, p. 943–956, 2013.

MURAT, J. B.; SOUVIGNET, A.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; BOST-BRU, C.; PELLOUX, H. Assessment of the IgA immunosorbent agglutination assay for the diagnosis of congenital toxoplasmosis on a series of 145 toxoplasmic seroconversions. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 4, p. 456–458, 2015.

MURRAY, D. M. Sample size, detectable difference, and power. In: Scheier LM, Dewey WL, editors. The complete writing guide to NIH behavioral science grants. New York, NY: Oxford University Press, p. 89–106, 2008.

NAKAO, M.; KONISHI, E. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in human neutrophils in vitro. **Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 23-27, 1991.

NAKASHIMA, F.; PARDO, V. S.; MIOLA, M. P.; MURATA, F. H. A.; PADUAN, N.; LONGO, S. M.; DE MATTOS, C. C. B.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; RICCI, O.; DE MATTOS, L. C. Serum IgG Anti-Toxoplasma gondii Antibody Concentrations Do Not Correlate Nested PCR Results in Blood Donors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 461, 2019.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 147, p. 763-66, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 148, p. 369-72, 1909.

OLARIU, T. R.; REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; ALAM, A.; MONTOYA, J. G. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 12, p. 1056 – 1061, 2011.

OLIVEIRA AZEVEDO, C. T.; BRASIL, P. E.; GUIDA, L.; LOPES MOREIRA, M. E. Performance of Polymerase Chain Reaction Analysis of the Amniotic Fluid of Pregnant Women for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0149938, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0149938>. Acesso em: 05 set. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149938>.

OLIVEIRA, B. C. D. Toxoplasmose: perfil sorológico durante a gravidez e repercussões neonatais em maternidade pública de referência na cidade de Belém do Pará. 2002.

OPSTEEGH, M.; PRICKAERTS, S.; FRANKENA, K.; EVERS, E. G. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 2-3, p. 103-14, 2011.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; VIDAL, J. E.; SU, C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. **Future Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1363-79, 2009.

PERONA-WRIGHT, G.; MOHRS, K.; SZABA, F. M.; KUMMER, L. W.; MADAN, R.; KARP, C. L.; JOHNSON, L. L.; SMILEY, S. T.; MOHRS, M. Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 6, p. 503-512, 2009.

PEYRON, F; LOBRY, J. R; MUSSET, K; FERRANDIZ, J; GOMEZ-MARIN, J. E; PETERSEN, E; MERONI, V; RAUSHER, B; MERCIER, C; PICOT, S; CESBRON-DELAUW, M. F. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). **Microbes and Infection**, v. 8, n. 9-10, p. 2333-2340, 2006

PINHEIRO, B. V.; NOVIELLO, M. D. E. L.; CUNHA, M. M.; TAVARES, A. T.; CARNEIRO, A. C.; ARANTES, R. M.; VITOR, R. W. Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with *Toxoplasma gondii* strains obtained from

human cases of congenital disease. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 87-94, set, 2015.

POMARES, C.; DEVILLARD, S.; HOLMES, T. H.; OLARIU, T. R.; PRESS, C. J.; RAMIREZ, R.; TALUCOD, J.; ESTRAN, R.; SU, C.; DUBEY, J. P.; AJZENBERG, D.; MONTOYA, J. G. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* DNA Samples Isolated From Humans Living in North America: An Unexpected High Prevalence of Atypical Genotypes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 11, p. 1783-1791, 20 out. 2018.

POMARES, C.; MONTOYA, J. G. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2448-2454, out. 2016.

POSSENTI, A.; CHERCHI, S.; BERTUCCINI, L.; POZIO, E.; DUBEY, J. P.; SPANO, F. Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 14, p. 1639-49, 2010.

PRUSA, A. R.; KASPER, D. C.; OLISCHAR, M.; HUSSLEIN, P.; POLLAK, A.; HAYDE, M. Evaluation of serological prenatal screening to detect *Toxoplasma gondii* infections in Austria. **Neonatology**, v. 103, n. 1, p. 27-34, 2013.

RAVDIN, J.I. Protozoal Disease. In: MANDELL, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Disease**. 4. ed. Churchill Livingstone, v. 2, p. 2393-5, 1995.

REISS, M.; VIEBIG, N.; BRECHT, S.; FOURMAUX, M. N.; SOETE, M.; DI CRISTINA, M.; DUBREMETZ, J. F.; SOLDATI, D. Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 3, p. 563-578, 2001.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. Chapter 31. In: JS Remington and J Klein, eds. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant 6th ed.** WB Saunders, Philadelphia, 947-1092, 2006.

RETMANASARI, A.; WIDARTONO, B. S.; WIJAYANTI, M. A.; ARTAMA, W. T. Prevalence and Risk Factors for Toxoplasmosis in Middle Java, Indonesia. **EcoHealth**, v. 14, n. 1, p. 162-170, 2017.

REZENDE, H. H. A.; STORCHILO, H. R.; LIMA, J. A. S.; GOMES JÚNIOR, A. R.; GOMES, T. C.; SOUZA, J. Y.; AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N. D.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Nursing infant with acquired toxoplasmosis in the first months of life - a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 59, e63, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652017005000410&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 05 Set. 2019. Epub 24 ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201759063>.

REZENDE, H. H. A. **Epidemiologia molecular de isolados de Toxoplasma gondii na região metropolitana de Goiânia, Goiás, Brasil**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Instituto de Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

ROBERT-GANGNEUX, F.; BELAZ, S. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 4, p. 330-339, ago. 2016.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DUPRETZ, P.; YVENOU, C.; QUINIO, D.; POULAIN, P.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX JP. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 33-38, 2010.

RODRIGUES, I. M. X.; CASTRO, A. M.; GOMES, M. B. F.; AMARAL, W. N.; AVELINO, M. M. Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of serological methods to detect anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 434-440, 2009.

ROSSO, F.; LES, J. T.; AGUDELO, A. Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Cali, Colombia, South America. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 3, p.504-508, 2008.

SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. **Science**, v. 85, p. 336-338, 1937.

SAID, B.; HALSBY, K. D.; O'CONNOR, C. M.; FRANCIS, J.; HEWITT, K.; VERLANDER, N. Q.; GUY, E.; MORGAN, D. Risk factors for acute toxoplasmosis in England and Wales. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 1, p. 23-29, 2017.

SAKIKAWA, M; NODA, S; HANAOKA, M; NAKAYAMA, H; HOJO, S; KAKINOKI, S; NAKATA, M; YASUDA, T; IKENOUE, T; KOJIMA, T. Anti-*Toxoplasma* antibody prevalence, primary infection rate, and risk factors in a study of toxoplasmosis in 4,466 pregnant women in Japan. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 3, p. 365-367, 2012.

SANTANA, R. M.; ANDRADE, F. M.; MORON, A.F. Infecções TORCH e gravidez. In: Prado FC, Ramos J, Ribeiro do Valle J. Atualização terapêutica. **Artes Médicas**. São Paulo, 2003.

SANTOS, A. L. C.; TRETTEL, A. C. P. T.; RIBEIRO, L. J. B. B.; VASCONCELLOS, M. L.; ZENAZOKENAE, L. E.; SANTOS, M. A.; DE LEMOS, E. R. S.; AMENDOEIRA, M. R. R. Serological study on toxoplasmosis in the Haliti-Paresí community of the Utiariti indigenous territory, Campo Novo do Parecis, Mato Grosso, Brazil. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 5, p. e00097, 2019.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human genetics**, v. 90, n. 6, p. 655-656, 1993.

SARTORI, A. L; MINAMISAVA, R; AVELINO, M. M; MARTINS, C. A. Triagem pré-natal para toxoplasmose e fatores associados à soropositividade de gestantes em Goiânia, Goiás. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 2, p. 93-8, 2011.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ÂNGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: Opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infections**, v.12, n.6, p. 504-12, 2006.

SEVERANCE, E. G.; XIAO, J.; JONES-BRANDO, L.; SABUNCIYAN, S.; LI, Y.; PLETNIKOV, M.; PRANDOVSKY, E.; YOLKEN, R. *Toxoplasma gondii*-A Gastrointestinal Pathogen Associated with Human Brain Diseases. **International Review of Neurobiology**, v. 131, p. 143-163, out. 2016.

SHAAPAN, R. M.; EL-NAWAWI, F. A.; TAWFIK, M. A. A. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 3-4, p. 359-362, 2008.

SHADDEL, M.; EBRAHIMI, M.; TABANDEH, M. R. Bioinformatics analysis of single and multi-hybrid epitopes of GRA-1, GRA-4, GRA-6 and GRA-7 proteins to improve DNA vaccine design against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, n. 2, p. 269-276, 2018.

SHWAB, E. K.; ZHU, X. Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453-461, 2014.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 82, 1992.

SIBLEY, L. D.; Khan, A.; Ajioka, J. W.; Rosenthal, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.

SILVA, L. A.; ANDRADE, R. O.; CARNEIRO, A. C. A. V.; VITOR, R. W. A. Overlapping *Toxoplasma gondii* Genotypes Circulating in Domestic Animals and Humans in Southeastern Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p.e90237, 2014.

SILVA, M. G.; CÂMARA, J. T.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Epidemiological factors associated with seropositivity for toxoplasmosis in pregnant women from Gurupi, State of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 469-75, 2014.

SILVEIRA, C; FERREIRA, R; MUCCIOLI, C; NUSSENBLATT, R; BELFORT, R. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n. 2, p. 370-371, 2003.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p. 253-260, 2010.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E. S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

SPEER, C. A.; CLARK, S.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 505-12, 1998.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. **Rev. Soc. Scient**, v. 3, p. 109-12, 1908.

SROKA, S; BARTELHEIMER, N; WINTER, A; HEUKELBACH, J; ARIZA, L; RIBEIRO, H; OLIVEIRA, F. A; QUEIROZ, A. J; ALENCAR, C. J. R; LIESENFELD, O. Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 528-533, 2010.

STORCHILO, H. R.; REZENDE, H. H. A.; GOMES, T. C.; DE SOUZA, J. Y.; GOMES JUNIOR, A. R.; AVELINO, M. M.; DO AMARAL, W. N.; DE CASTRO,

A. N.; Basic heel prick test: inclusion of screening, diagnosis and criteria for early confirmation of congenital infection by *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 61, e30, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652019005000214&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 05 set. 2019. 19 jun 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201961030>.

STROEHLE, A; SCHMID, K; HEINZER, I; NAGULESWARAN, A; HEMPHILL, A. Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 561-564, 2005.

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 201-210, 2009.

TEIXEIRA, G. M. **Avaliação de marcadores de infecção aguda e do teste de avides de igg em mulheres em idade fértil e/ou gestantes infectadas por *Toxoplasma gondii***. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

THIÉBAUT, R; LEPROUST, S; CHÊNE, G; GILBERT, R; SYROCOT (SYSTEMATIC REVIEW ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS STUDY GROUP). Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. **The Lancet**, v. 369, n. 9556, p. 115-122, 2007.

THULLIEZ, P. Maternal and fetal infection. In: Joynson DH, Wreghitt TG. *Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide*. Cambridge: Cambridge University, p. 193-213, 2001.

TILAHUN, B.; HAILU, Y.; TILAHUN, G.; ASHENAFI, H.; VITALE, M.; DI MARCO, V.; GEBREMEDHIN, E. Z. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in humans in East Hararghe Zone, Ethiopia. **Epidemiology Infection**, v. 144, n. 1, p. 64-71, 2016.

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, p. 501-508, 2013.

TORREY, E. F; BARTKO, J. J.; YOLKEN, R. H. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. **Schizophrenia bulletin**, v. 38, n. 3, p. 642-647, 2012.

TORREY, E. F; BARTKO, J. J; LUN, Z. R; YOLKEN, R. H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. **Schizophrenia bulletin**, v. 33, n. 3, p. 729-736, 2006.

TOURDJMAN, H; TCHÉANDJIEU, C; DE VALK, H; GOULET, V; LE STRAT, Y. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France: Évolution de la séroprévalence et des facteurs associés entre 1995 et 2010, à partir des Enquêtes nationales périnatales. English translation: Toxoplasmosis among pregnant women in France: Trends in seroprevalence and associated factors between 1995 and 2010. **Bull Epidemiology Hebd**, p. 264-72, 2015.

TOWBIN, H; STAEHELIN, T; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 335-338, 1993.

VASCONCELOS-SANTOS, D. V; MACHADO, A. D; CAMPOS, W. R; ORÉFICE, F; QUEIROZ-ANDRADE, G. M; CARELLOS, E. V; CASTRO R. M; JANUÁRIO, J. N; RESENDE, L. M; MARTINS-FILHO, O. A; DE AGUIAR V. C; ALMEIDA, V. R. W; CAIAFFA, W. T. UFMG. Congenital Toxoplasmosis Brazilian Group. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, v. 116, n. 2199-205, p. e1, 2009.

VIEIRA, F.P.; ALVES, M. D.; MARTINS, L. M.; RANGEL, A. L.; DUBEY, J. P.; COLINA, D.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. Toxoplasmose veiculada pela água

investigada e analisada sob avaliação hidrogeológica: novos dados e perspectivas para futuras pesquisas. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 929-35, 2015.

VILLENA, I; ANCELLE, T; DELMAS, C; GARCIA, P; BREZIN, A. P; THULLIEZ, P; WALLON, M; KING, L; GOULET, V. Toxosurv network and National Reference Centre for Toxoplasmosis. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. **Euro Surveill**, v. 15, n. 25, p. 19600, 2010.

WANG, Y; YIN, H. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 384, 2015.

WILKING, H.; THAMM, M.; STARK, K.; AEBISCHER, T.; SEEGER, F. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. **Scientific Reports**, v. 6, p. 22551, 2016.

YAMADA, H; TANIMURA, K; DEGUCHI, M; TAIRAKU, S; MORIZANE, M; UCHIDA, A; EBINA, Y; NISHIKAWA, A. A cohort study of maternal screening for congenital *Toxoplasma gondii* infection: 12 years' experience. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 6, p. 427-430, 2019.

YAMAMOTO, J. H; VALLOCHI, A. L; SILVEIRA, C; FILHO, J. K; NUSSENBLATT, R. B; CUNHA-NETO, E; GAZZINELLI, R. T, BELFORT, R. J. R; RIZZO, L. V. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 6, p. 2018-2022, 2000.

YAMAMOTO, M; STANDLEY, D. M; TAKASHIMA, S; SAIGA, H; OKUYAMA, M; KAYAMA, H; KUBO, E; ITO, H; TAKAURA, M; MATSUDA, T; SOLDATI-FAVRE, D; TAKEDA, K. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 12, p. 2747-2760, 2009.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer Comitê de Ética

UFG - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de proteínas antigênicas com potencial para prognóstico da toxoplasmose congênita sintomática em soros de recém-nascidos

Pesquisador: Ana Maria de Castro

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 81628117.4.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.901.669

Apresentação do Projeto:

Resumo:

A toxoplasmose congênita é considerada importante causa mundial de mortalidade e morbidade infantil, constituindo um importante problema de saúde pública. A maioria dos casos de infecção fetal é subclínica no nascimento, entretanto quando sintomático, pode apresentar anomalias graves.

A necessidade de técnicas sorológicas que possam auxiliar na confirmação da infecção congênita, como do prognóstico desta infecção se faz necessária, pois o diagnóstico da toxoplasmose congênita é complexo já que a infecção pelo *Toxoplasma gondii* geralmente não apresenta ou não especifica sinais clínicos característicos dessa doença. Este trabalho tem como objetivo identificar proteínas antigênicas com potencial para serem

marcadores de diagnóstico para infecção congênita por meio das técnicas sorológicas de Western Blot e Elisa em amostras de soro de recém nascidos com toxoplasmose congênita, e correlacionar estas proteínas com o prognóstico da infecção congênita. A detecção de antígenos proteicos, que possam ser marcadores da toxoplasmose congênita, como também possam ser relacionados ao prognóstico em crianças congenitamente infectadas com e sem sintomatologia, poderia ser um avanço na confirmação e prognóstico desta infecção.

Metodologia Proposta:

Este estudo é coorte, será analisado um total de 100 amostras no período de dois anos 2017-

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.901.669

2018. As amostras biológicas que serão utilizadas (soro) são de recém-nascidos, crianças e adultos, que já foram coletadas e estão armazenadas na soroteca do Laboratório de Estudos da Relação Parasito Hospedeiro na Universidade Federal de Goiás (LAERPH – UFG). Todas as amostras são provenientes do projeto “Triagem sorológica em recém-nascidos para Toxoplasmose e Tripanossomíase Americana através da inclusão destes a ser implementada pelo SUS no teste do pezinho visando o diagnóstico precoce da infecção congênita” aprovado pelo comitê de ética, parecer: 943.441. Os participantes assinaram o Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido e aceitaram que suas amostras biológicas fossem utilizadas em pesquisas futuras. Também será incluída a pesquisa as amostras que forem coletadas durante o período de execução do projeto. Todas as amostras presentes na soroteca foram submetidas a exames sorológicos para toxoplasmose detectando as classes de anticorpos IgM e IgG pelo teste de Elisa e também por teste molecular (PCR). As 100 amostras biológicas serão selecionadas de acordo com os critérios acima descritos, e divididas em quatro grupos com 25 cada: 1 Grupo controle negativo (GCN): recém-nascidos não infectados pelo T. gondii que apresentaram resultado negativo para anticorpos IgM, IgG anti-T. gondii ao final de 12 meses e PCR negativo. 2 Grupo controle positivo (GCP): indivíduos cronicamente infectados pelo T. gondii: presença de anticorpos IgG anti-T. gondii (toxoplasmose adquirida). 3 Grupo controle toxoplasmose congênita com sintomatologia (GCTCS): Recém-nascidos congenitamente infectados pelo T. gondii que apresentaram persistência de anticorpos IgG anti-T. gondii ao final de 12 meses, e/ou com diagnóstico parasitológico positivo por PCR, apresentando sintomatologia até um ano de idade. 4 Grupo controle toxoplasmose congênita assintomática (GCTCA): Recém-nascidos congenitamente infectados pelo T. gondii que apresentaram persistência de anticorpos IgG anti-T. gondii ao final de 12 meses e/ou com diagnóstico parasitológico positivo por PCR, assintomáticas até um ano de idade. Entre os grupos de estudo mencionados acima será realizada uma comparação do perfil de proteínas antigênicas por Western Blot e avaliação das proteínas ESAs no diagnóstico sorológico da toxoplasmose congênita pelos testes de Elisa e Western Blot, comparando os resultados encontrados com a sorologia convencional. O

acompanhamento clínico dessas crianças foi e será realizado pela coleta de informações em prontuários e pelo acompanhamento das consultas de crianças recentemente detectadas com toxoplasmose congênita no LAERPH-UFG, as quais serão encaminhadas para atendimento por profissionais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG) e posteriormente submetidas a exames para avaliar possível comprometimento oftalmológico

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.901.669

(fundoscopia), neurológico (ultrassom transfontanela, radiografia de crânio e, se necessário, tomografia computadorizada de crânio) e auditivo (avaliação comportamental, emissões otoacústicas e PEATE).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar proteínas antigênicas com potencial para serem marcadores de diagnóstico para infecção congênita por meio das técnicas sorológicas de Western Blot e Elisa em amostras de soro de recém nascidos com toxoplasmose congênita, e correlacionar estas proteínas com o prognóstico da infecção congênita.

Objetivo Secundário:

- Analisar a sensibilidade e especificidade do teste Elisa utilizando ESAs, com os resultados da sorologia convencional. • Comparar os resultados encontrados nas técnicas de Western Blot com antígenos brutos e com ESAs. • Identificar por Western Blot, proteínas antigênicas com potencial para diagnóstico e prognóstico da toxoplasmose congênita. • Analisar o perfil de proteínas antigênicas no soro de crianças congenitamente infectadas pelo T. gondii e em amostras de soro de pessoas com toxoplasmose adquirida. • Comparação do perfil de proteínas antigênicas no soro de crianças congenitamente infectadas pelo T. gondii com sintomatologia e com amostras de crianças congenitamente infectadas sem sintomatologia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Sobre os riscos a pesquisadora informa que "Os prováveis riscos podem ocorrer pela compressão inadequada do local da punção venosa após a retirada da agulha, mas esse risco se deve a própria coleta.

Benefícios:

Sobre os benefícios a pesquisadora informa que "O diagnóstico de toxoplasmose congênita é complexo e a identificação de antígenos proteicos, que possam ser marcadores da toxoplasmose congênita, como também possam ser relacionados ao prognóstico em crianças congenitamente infectadas com e sem sintomatologia, poderia ser um avanço na confirmação e prognóstico desta infecção.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.901.669

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se das respostas das pendências referentes ao Parecer Número:2.781.398

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Respostas das pendências referentes ao Parecer Número: 2.781.398

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

4. TEXTO NO TCLE:

"1.5 Consentimento da Participação na Pesquisa:Eu,....., inscrito(a)sob o RG/CPF....., abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado ".....". Informo ter mais de 18 anos de idade e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo pesquisador(a) responsável..... sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito." Carta Circular nº 51-SEI/2017-CONEP/SECNS/MS referente a Esclarecimentos adicionais sobre a redação do TCLE diz o seguinte: 1. Considerando o item II.23 da Resolução CNS nº 466 de 2012, que define TCLE como "documento no qual é explicitado o consentimento livre e esclarecido do participante e/ou de seu responsável legal, de forma escrita, devendo conter todas as informações necessárias, em linguagem clara e objetiva, de fácil entendimento, para o mais completo esclarecimento sobre a pesquisa a qual se propõe participar.". 2. Considerando o Manual de Orientações: Pendências frequentes em protocolos de pesquisa clínica, elaborado em 2015 por esta Comissão, em seu item 1.1.c, que define: "O termo de consentimento é um documento que deve ser redigido no formato de convite. Não é adequado que o corpo do TCLE seja escrito como declaração, já que isto pode reduzir a autonomia do indivíduo. Exemplo: "Eu sei que haverá coleta de material" ou, ainda, "eu declaro que comparecerei às visitas", "ao assinar este documento, autorizo a consulta aos prontuários", etc. As sentenças devem ser redigidas com afirmações do pesquisador dirigidas ao participante de pesquisa. Exemplos: "será coletado um pouco de sangue da veia do seu braço (...)", "gostaríamos de pedir autorização para verificar o seu prontuário".

3. Considerando que diversos TCLE incluem, na parte final, uma síntese dos pontos já apresentados, para a confirmação do participante de pesquisa, além da sua assinatura e do

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cepcufg@yahoo.com.br

UFG - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



Continuação do Parecer: 2.901.669

pesquisador responsável, esta Comissão orienta que: a) Reafirmando o exposto na Resolução CNS nº 466 de 2012 e nas demais normativas éticas, no que tange ao TCLE, entende-se que a assinatura do participante de pesquisa, por si só, basta para consagrar seu consentimento para ser incluído no estudo; b) No caso de TCLE que tenha um conteúdo de síntese/resumo ao final, este deve ser redigido com o ponto de vista do pesquisador, e não na forma de declaração do participante da pesquisa. Assim, é aceitável que o trecho final tenha frases como "Você pode sair do estudo quando quiser, sem qualquer prejuízo a você", ou "Vamos realizar quatro coletas de sangue no período do estudo", deixando claro que se trata de uma síntese para o participante que está lendo o documento, antes que ele aponha sua assinatura. c) Caso o pesquisador queira inserir uma frase final declarativa do participante de pesquisa, como citado no Manual de Pendências (item 1.c "Contudo, é aceitável que a parte final do TCLE, em que estão os campos de assinatura e na qual participante manifesta o seu desejo, esteja escrita como declaração."), esta deve ter redação simples, como "li e concordo em participar da pesquisa" ou "declaro que concordo em participar da pesquisa". Ressalta-se que não devem ser introduzidas novas informações ou informações contraditórias ao conteúdo do restante do termo.

PENDÊNCIA ATENDIDA

6. Anexar o Parecer Consubstanciado 943.441 citado neste Projeto.

PENDÊNCIA ATENDIDA

Uma vez que as pendências foram devidamente atendidas não existe mais óbices éticos no projeto de pesquisa analisado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional CNS 001/13, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, através de Notificação via Plataforma Brasil, os relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

**UFG - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS**



Continuação do Parecer: 2.901.669

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_945770.pdf	02/08/2018 19:18:56		Aceito
Outros	respostasdaspendencias.pdf	02/08/2018 19:17:34	Ana Maria de Castro	Aceito
Parecer Anterior	parecerconsubiadocep.pdf	02/08/2018 19:14:49	Ana Maria de Castro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimentolivreeclarecido.pdf	02/08/2018 19:13:41	Ana Maria de Castro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	certidaodoutorado.pdf	12/12/2017 20:30:27	Ana Maria de Castro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodoutorado.pdf	31/07/2017 11:29:13	Ana Maria de Castro	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostodoutorado.pdf	31/07/2017 10:22:38	Ana Maria de Castro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 18 de Setembro de 2018

**Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador(a))**

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cepcufg@yahoo.com.br

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

PROFA. DRA. ANA MARIA DE CASTRO – LABORATÓRIO DE ESTUDO DA RELAÇÃO PARASITO –
LAERPH/DMIPP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você/Sr./Sra. está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “Identificação de proteínas antigênicas com potencial para prognóstico da toxoplasmose congênita sintomática em soros de recém-nascidos”. Ana Maria de Castro e Heloisa Ribeiro Storchilo, somos as pesquisadoras responsáveis por esta pesquisa. Nossa área de atuação é a parasitologia (área da saúde). Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence ao arquivo do pesquisador(a) responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas pelo(s) pesquisador(es) responsável(is), via e-mail (lo_storchilo@hotmail.com) e, inclusive, sob forma de ligação a cobrar, através do(s) seguinte(s) contato(s) telefônico(s): (62) 982584709/(62)3209-6364. Ao persistirem as dúvidas *sobre os seus direitos* como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62) 3269 8338 e (62) 3269 8426 ou no endereço: 1ª Avenida S/Nº Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar. Horário de funcionamento: 2ª a 6ª das 7:00 às 17:00hs.

1. Informações Importantes sobre a Pesquisa:

1.1 **Título:** Identificação de proteínas antigênicas com potencial para prognóstico da toxoplasmose congênita sintomática em soros de recém-nascidos

1.2 **Justificativa:** A toxoplasmose congênita é considerada importante causa mundial de mortalidade e morbidade infantil, constituindo um importante problema de saúde pública. A maioria dos casos de infecção fetal é subclínica no nascimento, entretanto quando sintomático, pode apresentar anomalias graves. Um estudo comparativo de crianças infectadas congenitamente no Brasil e na Europa mostrou que, independentemente do tratamento, as crianças brasileiras tiveram um risco cinco vezes maior do que as crianças europeias para o desenvolvimento de lesões oculares e que em 79,8% dos recém-nascidos infectados congenitamente apresentavam lesões retinocoroideanas em pelo menos um olho. Diante dos trabalhos desenvolvidos, a necessidade de técnicas sorológicas que possam auxiliar na confirmação da infecção congênita, como do prognóstico desta infecção se faz necessária, pois o diagnóstico da toxoplasmose congênita é complexo já que a infecção pelo *T. gondii* geralmente não apresenta ou não especifica sinais clínicos característicos dessa doença. A detecção de antígenos proteicos, que possam ser marcadores da toxoplasmose congênita, como também possam ser relacionados ao prognóstico em crianças congenitamente infectadas com e sem sintomatologia, poderia ser um avanço na confirmação e prognóstico desta infecção.

Título da Pesquisa: Identificação de proteínas antigênicas com potencial para prognóstico da toxoplasmose congênita sintomática em soros de recém-nascidos

Nome e Rubrica do pesquisador:

Rubrica do sujeito participante:

TCLE – Pág. 1

1.3 Objetivo geral

- 1.3.1** Identificar proteínas antigênicas com potencial para serem marcadores de diagnóstico para infecção congênita por meio das técnicas sorológicas de Western Blot e Elisa em amostras de soro de recém-nascidos com toxoplasmose congênita, e correlacionar estas proteínas com o prognóstico da infecção congênita.

1.4 Procedimentos utilizados da pesquisa ou descrição detalhada dos métodos

- 1.4.1** Os prováveis riscos podem ocorrer pela compressão inadequada do local da punção venosa após a retirada da agulha, mas esse risco se deve a própria coleta. Caso apresente algum desconforto (mal-estar, angústia, irritação) o procedimento de coleta será interrompido imediatamente. Haverá ressarcimento de todos os gastos que o participante e seu(s) acompanhante(s) terão ao participar da pesquisa, como: transporte e a alimentação, tendo em vista que as ligações à pesquisadora podem ser feitas a cobrar. Todas as informações coletadas serão tratadas com sigilo, assegurando a sua privacidade e o anonimato. A opção de participação é totalmente voluntária, caso queira recusar a participar ou retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, não haverá penalizações. Todas as amostras e os dados coletados serão utilizados para esta pesquisa e as amostras biológicas coletadas serão armazenadas para estudos futuros. Os resultados serão publicados em artigos científicos, sejam eles favoráveis ou não, mas sempre com objetivo científico e respeitando todos os seus direitos.

() Declaro ciência de que os meus dados coletados podem ser relevantes em pesquisas futuras e, portanto, autorizo a guarda do material em banco de dados;

() Declaro ciência de que os meus dados coletados podem ser relevantes em pesquisas futuras, mas não autorizo a guarda do material em banco de dados;

Informamos ao/à participante sobre o direito de pleitear indenização (reparação a danos imediatos ou futuros), garantida em lei, decorrentes da sua participação na pesquisa.

Título da Pesquisa: Identificação de proteínas antigênicas com potencial para prognóstico da toxoplasmose congênita sintomática em soros de recém-nascidos

Nome e Rubrica do pesquisador:

Rubrica do sujeito participante:

TCLE – Pág. 2

1.5 Consentimento da Participação na Pesquisa:

Sr.^a/Sr....., RG/CPF.....
....., gostaríamos de pedir a sua autorização para participar do estudo intitulado “Identificação de proteínas antigênicas com potencial para prognóstico da toxoplasmose congênita sintomática em soros”. Sr.^a/Sr. deve ter mais de 18 anos de idade e destacamos que a sua participação é de caráter voluntário. O seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Goiânia, de de

Assinatura por extenso do(a) participante

Assinatura por extenso do(a) pesquisador(a) responsável

Testemunhas em caso de uso da assinatura datiloscópica



Título da Pesquisa: Identificação de proteínas antigênicas com potencial para prognóstico da toxoplasmose congênita sintomática em soros de recém-nascidos
Nome e Rubrica do pesquisador:
Rubrica do sujeito participante:
TCLE – Pág. 3

Anexo 3 – Comprovante de publicação do artigo

The Journal of Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



Identification of Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Congenital and Acute Toxoplasmosis

Heloisa Ribeiro Storchilo,¹ Giulianne Monteiro Teixeira,¹ André Luis Elias Moreira,² Tainara Cristina Gomes,¹ Clayton Luiz Borges,² and Ana Maria de Castro¹

¹Department of Parasitology, Laboratório da Relação Parasito-Hospedeiro, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, and ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Background. The diagnosis of congenital toxoplasmosis can be inconclusive in many cases. Despite the several serological tests developed, the literature on biomarkers that can assist in the diagnosis of congenital and acute toxoplasmosis is limited. The objective of this study was to analyze the immunoreactive profile of *Toxoplasma gondii* protein bands with the potential to be biomarkers for diagnosis and prognosis of congenital and acute toxoplasmosis.

Methods. Peripheral blood samples from women of childbearing age and/or pregnant women diagnosed with acquired toxoplasmosis as well as from congenitally infected children were selected and submitted to immunoblotting for analysis of the immunoreactive bands profile by immunoglobulin G (IgG) antibodies.

Results. When comparing the immunoreactive bands profile for antibodies present in samples from different groups and subgroups, the 150, 18.5, and 16.96-kDa bands were more immunoreactive with the antibodies present in serum samples from the acquired infection group. The 343, 189, 150, 75, and 42-kDa bands showed more chance to be detected by the symptomatic congenital infection subgroup samples, while the 61, 50, and 16.96-kDa bands were significantly immunoreactive with the acute infection subgroup samples.

Conclusions. The identification of these potential biomarkers can assist in early diagnosis and treatment of congenital toxoplasmosis.

Keywords. immunoblotting; congenital toxoplasmosis; prognosis.

Anexo 4 – Artigos publicados durante o período de execução do doutorado

1. Publicação em 2017:

1.1. REZENDE, H. H. A.; STORCHILO, H. R.; LIMA, J. A. S.; GOMES JÚNIOR, A. R.; GOMES, T. C.; SOUZA, J. Y.; AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N. D.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Nursing infant with acquired toxoplasmosis in the first months of life - a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, e63, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759063>

REVISTA
DO
INSTITUTO
DE
MEDICINA
TROPICAL
DE
SÃO PAULO
JOURNAL OF THE SÃO PAULO
INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

CASE REPORT

<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759063>

Nursing infant with acquired toxoplasmosis in the first months of life – a case report

Hanstter Hallison Alves Rezende¹, Heloísa Ribeiro Storchilo¹, Jaqueline Ataíde Silva Lima¹, Antônio Roberto Gomes Júnior¹, Taynara Cristina Gomes¹, Jéssica Yonara de Souza¹, Mariza Martins Avelino², Waldemar Naves do Amara², Marina Clare Vinaud¹, Ana Maria de Castro¹

ABSTRACT

Toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii* and the probability of this infection occurring in the first months of life is usually low because its transmission is related to eating habits. A 6-month-old nursing infant was diagnosed with acute toxoplasmosis, which was identified through anti-*T. gondii* IgA, IgM and low-avidity IgG serologic assays, polymerase chain reaction (PCR) and mouse bioassay test although its mother was seronegative. This serological divergence between mother and child led us to interview the mother regarding epidemiological factors. During this interview, she reported that she had given her 2-month-old baby a piece of undercooked beef to suck on. After some time, the baby presented fever and cervical lymphadenitis. This report emphasizes the importance of serological surveys of toxoplasmosis in nursing infants presenting with fever and lymphadenitis, in view of the possible acquisition of toxoplasmosis in the first months of life.

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*. Nursing infant. Diagnostic.

2. Publicação em 2018:

2.1. AVELAR, J. B.; SILVA, M. G.; REZENDE, H. H. A; STORCHILO, H. R.; AMARAL, W. N.; XAVIER, I. R.; AVELINO, M. M.; CASTRO, A. M. Epidemiological factors associated women treated in the public healthcare system of Goiânia, State of Goiás, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.51, n. 1, p. 57-62, 2018. DOI: 10.1590/0037-8682-0112-2017



Rev Soc Bras Med Trop 51(1):57-62, January-February, 2018
doi: 10.1590/0037-8682-0112-2017

Major Article

Epidemiological factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in postpartum women treated in the public healthcare system of Goiânia, State of Goiás, Brazil

**Juliana Boaventura Avelar^[1], Marcos Gontijo da Silva^[2], Hanstter Hallison Alves Rezende^[1],
Heloisa Ribeiro Storchilo^[1], Waldemar Naves do Amaral^[3], Isolina Rodrigues Xavier^[3],
Mariza Martins Avelino^[3] and Ana Maria de Castro^[1]**

[1]. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

[2]. Centro Universitário, UNIRG, Gurupi, TO, Brasil.

[3]. Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

Abstract

Introduction: Knowledge of the epidemiological profile and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among postpartum women is a relevant issue, because this protozoan can be vertically transmitted to the developing fetus, which can cause severe and debilitating disease. The aim of this study was to assess the risk factors associated with *T. gondii* infection in postpartum women in Goiânia, GO, Brazil. **Methods:** This cross-sectional study comprised 229 postpartum women, among whom 204 were chronically infected (IgG+/IgM-), and 25 were seronegative (IgG-/IgM-; control group). All the patients were asked to complete a form to provide sociodemographic, clinical, dietary, and cultural information. The data were analyzed to compare seropositivity and risk factors based on the odds ratio (OR) thereof. **Results:** The sociodemographic characteristics associated with the risk for toxoplasmosis were: education ≤ 8 years [OR: 2.521, confidence interval (CI): 1.01-6.301, $p=0.049$], and age ≥ 30 years (OR: 4.090; CI: 1.180-14.112, $p=0.023$). Clinical and behavioral characteristics related to eating raw and undercooked meat, were not found to be risk factors associated with a positive test for toxoplasmosis. **Conclusions:** Our findings concur with the results of other studies conducted in Brazil and abroad, where variables such as low levels of schooling, and advanced age (≥ 30 years) are major risk factors for pregnant women to become infected with *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Postpartum women. Diagnosis. Risk factors.

3. Publicações em 2019:

3.1. STORCHILO, H. R.; REZENDE, H. H. A.; GOMES, T. C.; SOUZA, J. Y.; JUNIOR, A. R. G.; AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N.; CASTRO, A. M. Basic heel prick test: inclusion of screening, diagnosis and criteria for early confirmation of congenital infection by *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, p. e30, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1590/S1678-9946201961030>

REVISTA
DO
INSTITUTO
DE
MEDICINA
TROPICAL
DE
SÃO PAULO
JOURNAL OF THE SÃO PAULO
INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

<http://doi.org/10.1590/S1678-9946201961030>

Basic heel prick test: inclusion of screening, diagnosis and criteria for early confirmation of congenital infection by *Toxoplasma gondii*

Heloisa Ribeiro Storchilo¹, Hanstter Hallison Alves Rezende², Taynara Cristina Gomes¹, Jéssica Yonara de Souza¹, Antonio Roberto Gomes Junior¹, Mariza Martins Avelino³, Waldemar Naves do Amaral³, Ana Maria de Castro¹

ABSTRACT

Toxoplasma gondii can cross the placental barrier, causing fetal infection with potentially severe sequelae. The aim of this study was to evaluate whether the serological screening for toxoplasmosis should be included in the basic neonatal heel prick test in order to establish criteria for the confirmation and/or exclusion of the diagnosis of congenital infection in newborns treated at three public health units in the metropolitan region of Goiânia, Goiás State, Brazil. Blood samples were collected on filter paper from newborns and later, peripheral blood samples from the mothers and their respective children were obtained to confirm or exclude the diagnosis of suspected congenital infection, by means of an enzyme-linked immunosorbent assay (IgM and IgG) and a polymerase chain reaction assay. From a total of 1,159 blood samples collected on filter paper, 43.92% were reactive to IgG and 0.17% to anti-*T. gondii* IgM and IgG. One hundred and twenty-seven paired samples (mother and child) were collected following consensual protocols for peripheral blood collection. Results obtained from the filter paper and peripheral blood of the newborns were 90.55% concordant. A comparison of the mother and child blood test results showed agreement regarding the detection of IgG in 90.48% of the samples. The parasite DNA was detected in the peripheral blood of one child. In view of the results obtained in this study, the inclusion of the serological screening for toxoplasmosis in the newborn heel prick test proved to be effective for the early detection of congenital *T. gondii* infection.

KEYWORDS: Serological tests. Neonatal screening. Newborn. Congenital toxoplasmosis. Heel prick test.

¹Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, Goiás, Brazil
²Universidade Federal de Goiás, Unidade

3.2. REZENDE, H. H. A.; STORCHILO, H. R.; AVELAR, J. B.; SILVEIRA, M. B.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em gatos errantes (*Felis catus domesticus*) em Goiânia, Goiás, Brasil. **Multi-Science Journal**, v. 2, n.1, p. 86-88, 2019.

Multi-Science Journal, v.2, n. 1 (2019) 86-88



**INSTITUTO
FEDERAL**
Goiano

Conteúdo disponível em: <https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/>

Multi-ScienceJournal

Website do periódico: <https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/Index.php/multiscience>



Artigo Original

FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* EM GATOS ERRANTES (*Felis catus domesticus*) EM GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL

Hânstter Hallison Alves Rezende¹, Heloísa Ribeiro Storchilo², Juliana Boaventura Avelar³, Murilo Barros Silveira^{3*}, Marina Clare Vinaud⁴, Ana Maria de Castro⁴

¹Professor do curso de Biomedicina, Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Regional Jataí, Universidade Federal de Goiás-UFG.

²Laboratório de Estudos das Relações Parasito-Hospedeiro, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás-UFG.

³Blomédico (TAE), Laboratório de Imunidade Natural, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás-UFG.

⁴Professora no Departamento de Imunologia, Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás- UFG.

*Autor para correspondência: E-mail: murilo_bsilveira@hotmail.com

INFO ARTICLE

Histórico do artigo
Recebido: 21 de março de 2019
Aceito: 25 de junho de 2019

Palavras-chaves:
Gatos
Sorologia
Toxoplasma gondii
Toxoplasmose

RESUMO

O gato doméstico (*Felis catus domesticus*) é um importante transmissor de agentes zoonóticos para o homem, em especial *Toxoplasma gondii*. O gato infectado é capaz de eliminar milhões de oocistos no meio ambiente, provocando uma contaminação maciça nestes locais, sendo considerado um problema de saúde pública. A toxoplasmose é uma doença com alta prevalência em todo o mundo, sendo o gato responsável pela perpetuação do parasito. O objetivo deste trabalho foi verificar a frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo teste de aglutinação modificado (MAT) em gatos errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Goiânia, Goiás no ano de 2016. Foram coletadas 50 amostras sanguíneas de gatos e foi realizado o MAT. Ao analisar a frequência de anticorpos 64% (32/50) eram soropositivos e 36% (18/50) soronegativos. Com isso ressaltamos a importância do gato doméstico na epidemiologia da toxoplasmose, por ser o perpetuador do parasito no meio ambiente. A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos errantes ainda não havia sido determinada no estado de Goiás, esses resultados contribuem com a literatura para analisar a distribuição do parasito e favorecer estudos da epidemiologia da doença.

3.3. REZENDE, H. H. A.; LIMA, J. A. S.; JUNIOR, A. R. G.; MELO, J. O.; STORCHILO, H. R.; GOMES, T. C.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Detection of DNA and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in errant cats (*Felis catus domesticus*, linnaeus, 1758) captured by the zoonoses control center of Goiânia, state of Goiás, Brazil. **Revista de Biologia Neotropical / Journal of Neotropical Biology**, v. 16, n. 2, p. 84-88, 2019.

DETECTION OF DNA AND ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* ANTIBODIES IN ERRANT CATS (*FELIS CATUS DOMESTICUS*, LINNAEUS, 1758) CAPTURED BY THE ZOONOSIS CONTROL CENTER OF GOIÂNIA, STATE OF GOIÁS, BRAZIL

HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE

Universidade Federal de Jataí, Câmpus Cidade Universitária, BR 364, km 195, n. 3800, 75801-615, Jataí, Goiás, Brasil, hanstter@gmail.com

JAQUELINE ATAÍDE SILVA LIMA

ANTÔNIO ROBERTO GOMES-JÚNIOR

JADE DE OLIVEIRA MELO

HELOÍSA RIBEIRO STORCHIO

TAYNARA CRISTINA GOMES

MARINA CLARE VINAUD

ANA MARIA DE CASTRO

84

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, Goiás, Brasil, amaria.ana@gmail.com

Abstract: The purpose of this study was to verify the seropositivity of IgG anti-*T. gondii* antibodies in serum samples and to detect *T. gondii* DNA detection in tissue from stray cats captured by the Zoonosis Control Center (ZCC) of Goiânia, state of Goiás, during 2016. Antibodies were analyzed by means of an indirect hemagglutination assay (IHA), while DNA was detected by polymerase chain reaction (PCR), using primers that amplify the B1 gene in specimens of brain, muscle and heart from the animals. The serological analysis revealed that 87.4% (21/24) of the cats were positive and the molecular test indicated a positivity rate of 75% (18/24). These high rates of serological and molecular detection are worrisome for public health because they confirm the important role cats play in environmental contamination, and hence, in the transmission of toxoplasmosis to humans.

Keywords: Toxoplasmosis, cats, hemagglutination, polymerase chain reaction, gene.

4. Publicações em 2020:

4.1. PERIM, L. V.; CUSTÓDIO, N. C. C.; LIMA, V. C. V.; IGREJA, J. A. S. L.; ALVES, D. S. M. M.; **STORCHILO, H. R.**; JÚNIOR, A. R. G.; CASTRO, A. M.; COSTA, W. L. G. and REZENDE, H. H. A. Occurrence of parasites in salads in restaurants in Aparecida de Goiânia, Goiás, Brazil. **Journal of Tropical Pathology**, v. 49, n.3, p. 207-214, 2020.

doi: 10.5216/rpt.v49i3.62681

SHORT COMMUNICATION

OCCURRENCE OF PARASITES IN SALADS IN RESTAURANTS IN APARECIDA DE GOIÂNIA, GOIÁS, BRAZIL

Lucas Veloso Perim¹, Natália Carneiro Canedo Custódio¹, Victória de Castro Vieira Lima¹, Jaqueline Ataíde Silva Lima da Igreja², Daniella de Sousa Mendes Moreira², Heloísa Ribeiro Storchilo², Antônio Roberto Gomes Júnior², Ana Maria de Castro², Webster Leonardo Guimarães da Costa³ and Hanstter Hallison Alves Rezende³

ABSTRACT

Parasitic diseases are the most widespread diseases in the world. They are transmitted via contaminated water or food. Considering that the daily consumption of vegetables is estimated at 142g per person, the purpose of this study was to evaluate the occurrence of parasites in salads available for consumption in restaurants in Aparecida de Goiânia, Goiás State. Salad samples were collected from the restaurants and parasitological analysis was performed using the Willis, Hoffman, Faust and Ziehl Neelsen techniques as well as cultures for the isolation of free-living amoebae. 51 samples were analyzed, 16 (31.4%) were positive. The parasites detected were: *Acanthamoeba* spp. in 12 (23.5%); free-living larvae, *Schistosoma mansoni* and *Entamoeba coli* in 1 (2.0%); *Endolimax nana* in 2 (3.9%). The PCR technique determined that 17.6% of the samples presented *Toxoplasma gondii* DNA. These techniques evidenced that the salad samples presented parasite contamination not only in the restaurants with the lowest price per Kg, but also in the most expensive ones. Therefore, in addition to effective sanitary surveillance, prophylactic measures are necessary regarding suppliers, handlers and restaurant owners to prevent the spread of these and other parasites.

KEY WORDS: Food contamination; food parasitology; polymerase chain reaction.