



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia



**Anticorpos presentes em amostras de líquido amniótico de pacientes com alto risco de toxoplasmose congênita reconhecem diferentes marcadores antigênicos de diferentes extratos proteicos de *Toxoplasma gondii***

**Lucas Vasconcelos Soares Costa**

**Uberlândia - MG**

**Fevereiro – 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Laboratório de Imunoparasitologia



**Anticorpos presentes em amostras de líquido amniótico de pacientes com alto risco de toxoplasmose congênita reconhecem diferentes marcadores antigênicos de diferentes extratos proteicos de *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte de obtenção do título de mestre

**Lucas Vasconcelos Soares Costa**

*Prof. Dr. José Roberto Mineo*  
Orientador

*Dra. Carolina Salomão Lopes*  
Coorientadora

**Uberlândia - MG**  
**Fevereiro - 2019**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Lucas Vasconcelos Soares Costa**

“Anticorpos presentes em amostras de líquido amnióticos de gestantes com alto risco de toxoplasmose congênita reconhecem diferentes marcadores antigênicos em extratos proteicos de cepas distintas de *Toxoplasma gondii*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 15 de fevereiro de 2019.

  
Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes - UFTM

  
Prof. Dra. Celene Maria de O. Simões Alves – ICBIM/UFU

  
Prof. Dr. José Roberto Mineo (orientador) – ICBIM/UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C837a  
2019 Costa, Lucas Vasconcelos Soares, 1991  
Anticorpos presentes em amostras de líquido amniótico de pacientes com alto risco de toxoplasmose congênita reconhecem diferentes marcadores antigênicos de diferentes extratos proteicos de *Toxoplasma gondii* [recurso eletrônico] / Lucas Vasconcelos Soares Costa. - 2019.

Orientador: José Roberto Mineo.

Coorientadora: Carolina Salomão Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1331>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Toxoplasmose congênita. 3. *Toxoplasma gondii*. 4. Líquido amniótico. I. Mineo, José Roberto, 1953, (Orient.). II. Lopes, Carolina Salomão, 1985, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

*Agradecimientos*

Ao Professor e orientador, **Prof. Dr. José Roberto Mineo**, muito obrigado por todo apoio, confiança depositada em mim ao longo da minha trajetória na UFU. Também pela a forma interessada e pertinente com que acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas e as discussões que foram essenciais para a minha formação. Serei eternamente grato por tudo o que você me proporcionou. Obrigado!

À minha co-orientadora, educadora, e principalmente amiga, **Dra. Carolina Salomão Lopes**. Muito obrigado por toda a paciência e dedicação com a qual lidou comigo ao longo do meu mestrado. Por toda a sua disponibilidade, pelos conselhos, risadas e repreensões. Com certeza você é um exemplo a ser seguido e fui privilegiado de poder aprender tanto com você. Muito obrigado!

Ao **Laurenço** e **Angélica** que deram inicio as coletas das amostras utilizadas neste trabalho e à **Priscila** que tanto me ajudou deste a iniciação nesta linha de pesquisa.

Aos profissionais do hospital que disponibilizaram as amostras e prontuários para que este projeto posse possível.

Aos amigos e colegas de laboratório **Tamires, Heber, Patricio, David, Eliézer, Vanessa M. Vanessa R., Flávia, Carolina M. e Mariana** que tonaram esta jornada muito mais agradável. Sempre serei grato por toda ajuda e apoio que tive de vocês neste período!

Aos Professores e Técnicos do LIP, **Tiago, Ana Cláudia, Cristina, Marley, “Junão” e Zilda**, que sempre se mostraram dispostos e dedicados em ajudar e aconselhar os alunos.

Aos demais professores, técnicos e alunos que tive o prazer de conhecer nesta universidade. Sou grato por todo apoio, disponibilidade e conselhos que me foram dados ao longo deste período. E sou muito feliz em saber que em muitos destes eu tenho amigos maravilhosos.

Aos meus pais, irmã, familiares e amigos que sempre estiveram lá por mim. Obrigado por todo apoio até nos piores momentos. Por cada risada e por cada choro compartilhado.

Minha sincera gratidão a todos que de alguma forma contribuíram não só para a construção deste trabalho, mas também para a minha formação pessoal.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório, é capaz de infectar uma variedade de hospedeiros podendo levar à toxoplasmose, geralmente, em indivíduos imunocomprometidos e gestantes. Tem sido aceito que a toxoplasmose congênita ocorre com a passagem de taquizoítos pela barreira placentária quando a gestante está na fase aguda da infecção, o que pode resultar em graves sequelas para o recém-nascido quando não tratada corretamente, entretanto já foram descritos casos de transmissão quando há uma segunda infecção por uma cepa de genótipo distinto. No líquido amniótico, fluido que dá suporte ao crescimento do embrião, é possível detectar taquizoítos em casos de transmissão congênita. Considerando a importância dos anticorpos presentes no líquido amniótico para a proteção fetal e que a infecção congênita também pode ocorrer em casos de reinfecção por uma cepa de genótipo diferente, este estudo investigou o perfil de reconhecimento dos anticorpos maternos presentes no líquido amniótico contra cepas clonais e recombinantes de *T. gondii*. Trinta e três amostras de líquido amniótico de pacientes classificadas como de alto risco para toxoplasmose congênita, em tratamento, foram adquiridas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Nas informações clínicas sobre as gestantes, obtidas de seus prontuários, a presença de IgG foi com moderada ou alta avidéz foi observada em 20 gestantes, sendo em cinco com baixa avidéz e uma negativa. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para dosar os níveis de IgG anti-*T. gondii* por ELISA indireto nos três grupos: (1) agudo, IgG negativo ou baixa avidéz; (2) Crônico, moderada ou forte avidéz; (3) Sem resultados relatados de avidéz. Em apenas uma paciente foi observado um resultado negativo para IgG no ELISA, e não houve diferença estatística significativa entre os títulos de IgG detectados entre os grupos. Extratos de antígeno solúvel (STAg) de duas linhagens clonais (RH e ME49) e três linhagens atípicas (UDI-1, UDI-2 e Santa Maria) foram separados por gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% para analisar a diferença das frações proteicas. O perfil eletroforético entre as cepas UDI-1, UDI-2, RH e ME49 foi semelhante e uma discreta diferença foi observada no isolado de Santa Maria. Os mesmos extratos também foram utilizados para realizar ensaios de *immunoblotting* para observar o perfil de reconhecimento antigênico das amostras de líquido amniótico humano contra as diferentes cepas. Além disto, foi realizado o ensaio de *immunoblotting*-avidéz nas amostras relatadas com baixa avidéz de IgG no prontuário. Verificou-se diferenças no padrão de reconhecimento antigênico entre as cepas analisadas, sendo que a UDI-1 apresentou nove frações reativas, sendo que, em cinco destas, foi a linhagem com o maior número de bandas reativas. No ensaio de avidéz, os anticorpos exibiram moderada a alta avidéz contra antígenos das cepas RH, ME49, UDI-1 e Santa Maria. Duas amostras de líquido amniótico mostraram baixa avidéz contra a UDI-2. Nossos resultados mostraram um perfil de reconhecimento de anticorpos diferente contra cepas distintas de *T. gondii*, sugerindo que os anticorpos produzidos durante a primeira infecção não necessariamente protegem contra uma reinfecção por diferentes cepas. Novos estudos são necessários para avaliar como diferentes genótipos podem diferir na produção de anticorpos IgG contra *T. gondii*, induzindo uma resposta humoral protetora ou não.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita, *Toxoplasma gondii*, Líquido amniótico, Proteção, antígenos.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite capable to infect a variety of hosts leading to toxoplasmosis. Generally, infected individuals are asymptomatic, but severe consequences for immunocompromised and pregnant women are described. Indeed, congenital toxoplasmosis occurs when tachyzoites pass throughout the placental barrier in pregnant women during the acute phase of infection leading to severe sequelae for the fetus and newborn if not properly treated. In cases of congenital transmission, it was possible to detect tachyzoites in amniotic fluid, a fluid that supports the growth of the embryo by reducing mechanical shocks and maintaining the temperature and pH. Considering the protection of antibodies presents in the amniotic fluid, the congenital infection can also occur in cases of reinfection with a different strain of the parasite. Thus, this study intended to investigate the behavior of maternal antibodies available in the amniotic fluid and its participation in fetal protection. Thirty-three amniotic fluid samples from patients at high risk of congenital toxoplasmosis, under treatment, were acquired by amniocentesis at the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Clinical information about the pregnant women was obtained from their medical records. These samples were centrifuged, and the supernatant was used for detection of anti-*T. gondii* IgG levels by indirect ELISA. The results showed that only one patient was IgG negative in ELISA, and no difference was detected between IgG titles of chronic and acute phase of infection. To analyze the differences between electrophoretic profile among strains, soluble antigen extracts of *T. gondii* (STAg) from two clonal strains (RH and ME49) and three atypical strains (UDI-1, UDI-2 and Santa Maria) were separated by polyacrylamide gel 12% SDS-PAGE. The electrophoretic profile among the strains UDI-1, UDI-2, RH and ME49 was similar and a slightly difference in the Santa Maria's isolate pattern was observed. The same extracts were also used to perform immunoblotting for determining the antigenic profile recognition of amniotic fluid samples against different strains. In addition, the immunoblotting-avidity assay was performed using samples with low IgG avidity reported in the medical records. It was demonstrated a distinct pattern of recognition by each strain. UDI-1 presented nine reactive fractions, being the one with the highest number of reactive bands. In avidity assay, antibodies exhibited moderate to high avidity against antigens from the RH, ME49, UDI-1 and Santa Maria strains. Two samples of amniotic fluid presented low avidity against UDI-2. Overall, our results showed a different antibody recognition profile against different strains of *T. gondii*, suggesting that antibodies produced during the first infection do not necessarily protect against reinfection by different strains. Additional studies will be necessary to understand how these *T. gondii* genotypes may interfere in the antibody production. And whether this distinct humoral response induced could be protective or not.

Key words: Congenital Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, Amniotic fluid, Protection, antigens.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis-3 etilbenzotiazolino-6 sulfônico (2,2' - <i>azinobis-3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid</i> )
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ( <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>Cepa ME49</b>	Cepa cistogênica de <i>T. gondii</i>
<b>Cepa RH</b>	Cepa altamente virulenta de <i>T. gondii</i>
<b>Cepa UDI-1</b>	TgChBrUD1, isolado de Uberlândia (MG) descrito como cepa de <i>T. gondii</i>
<b>Cepa UDI-2</b>	TgChBrUD2, isolado de Uberlândia (MG) descrito como cepa de <i>T. gondii</i>
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>dL</b>	Decilitros (unidade de volume)
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>g</b>	Força relativa da gravidade
<b>GRA</b>	Proteína de grânulo denso ( <i>Dense granule protein</i> )
<b>HC-UFU</b>	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
<b>HeLa</b>	Linhagem de célula imortalizada obtidas de um adenoma cervical, coletadas em 1951 de Henrietta Lacks
<b>HFF</b>	Linhagem de célula imortalizada proveniente de fibroblastos de prepúcio humano de recém-nascido
<b>IA</b>	Índice avides
<b>IB</b>	<i>Immunoblotting</i>
<b>IgA</b>	Imunoglobulina da classe A
<b>IgD</b>	Imunoglobulina da classe D
<b>IgE</b>	Imunoglobulina da classe E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina da classe G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina da classe M
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>LA</b>	Líquido Amniótico
<b>mA</b>	Milliampere
<b>mg</b>	Miligramas (unidade de peso)
<b>mL</b>	Militros (unidade de volume)

<b>MM</b>	Massa Molar
<b>mm</b>	Milímetros
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
<b>PCR-RFLP</b>	Polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphism)
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfatos
<b>PBS-T</b>	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20 a 0,05%
<b>PBS-T-M</b>	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20 a 0,05% e leite em pó desnatado
<b>PM</b>	Padrão de peso molecular
<b>RN</b>	Recém-nascido
<b>ROP</b>	Roptria
<b>RPMI</b>	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (1969)
<b>SAG</b>	Antígeno de superfície de <i>T. gondii</i> ( <i>Surface antigen of T. gondii</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
<b>STAg</b>	Antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>
<b>TC</b>	Toxoplasmose congênita
<b>UFU</b>	Universidade Federal de Uberlândia
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitros

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Informações dos prontuários das pacientes doadoras de LA soropositivas para a infecção por *T. gondii* 53

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ciclo lítico celular e estrutura de *T. gondii* 18
- Figura 2** – Ilustração do processo de diferenciação de taquizoítos em bradizoítos de *T. gondii* 19
- Figura 3** – Ciclo e formas de contaminação por *T. gondii* 22
- Figura 4.** (A) Análise do nível de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de LA de gestantes em fase aguda e crônica da infecção, segundo as informações sorológicas encontradas nos prontuários. Também foi demonstrado os resultados das amostras sem informações sobre avidez. O ponto vermelho representa a amostra A28. (B) Perfil de bandas antigênicas da amostra A28 contra UDI-1, UDI-2, RH, ME49 e Santa Maria obtidos por *Immunoblotting*. Padrão de peso molecular (PM) e massa molecular aparente (MM) expressos em KiloDaltons (kDa) representados, respectivamente, a esquerda e a direita. 55
- Figura 5.** Perfil proteico de antígenos solúveis de *T. gondii* das cepas UDI-1, UDI-2, RH, ME49 e Santa Maria em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) corado com coomassie azul. Peso molecular (PM) expresso em KiloDalton (kDa) (Padrões de Proteína *Novex® Sharp Pre-Stained*). 56
- Figura 6.** Perfil de bandas antigênicas de STAg e gráfico de frequência (%) de reconhecimento por anticorpos anti-*T. gondii* de amostras de LA contra (A) RH; (B) ME49; (C) UDI-1; (D) UDI-2; e (E) Santa Maria obtidos por *Immunoblotting*. A linha pontilhada indica a frequência de frações antigênicas em pelo menos 50% das amostras. Padrão de peso molecular (PM) e massa molecular aparente (MM) expressos em KiloDaltons (kDa) representados respectivamente a esquerda e a direita. 57
- Figura 7.** Perfil de bandas antigênicas reconhecidas em teste de avidez e índices de avidez de IgG contra (A) RH; (B) ME49; (C) UDI-1; (D) UDI-2; e (E) Santa Maria obtidos por *Immunoblotting*. A linha pontilhada indica a frequência de frações antigênicas em pelo menos 50% das amostras. Padrão de peso molecular (PM) e massa molecular aparente (MM) expressos em KiloDaltons (kDa) representados respectivamente a esquerda e a direita. 58

# Sumário

---

---

## RESUMO

## ABSTRACT

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE FIGURAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
1.1.1. Formas infectantes.....	17
1.1.2. Ciclo de vida.....	19
1.2. Caracterização de cepas.....	20
1.3. A Toxoplasmose.....	22
1.3.1. Toxoplasmose ocular .....	23
1.3.2. Toxoplasmose congênita .....	23
1.3.3. Diagnóstico .....	24
1.3.4. Tratamento e prevenção .....	25
1.3.5. Importância do LA na transmissão e diagnóstico da toxoplasmose .....	26
1.4. Imunidade relacionada a infecção por <i>T. gondii</i> .....	28
1.4.1. Imunidade Celular .....	28
1.4.2. Imunidade Humoral .....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
3.1. Objetivo geral .....	33
3.2. Objetivos específicos .....	33
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	34
4.1. Considerações éticas .....	35
4.2. Amostras de LA e análise de prontuários .....	35
4.3. Manutenção das cepas e preparo de antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> (STAg) .....	35
4.4. Análise de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) .....	36
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio SDS-PAGE e obtenção das membranas contendo os STAg.....	37
4.6. <i>Immunoblotting</i> (IB) para caracterização antigênica das frações de STAg das cinco cepas de <i>T. gondii</i> .....	38
4.7. <i>Imunoblot</i> -avidez para anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> .....	38
4.8. Análise estatística.....	39

<b>5. RESULTADOS</b> .....	40
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	50
<b>8. Tabelas</b> .....	52
<b>9. Figuras</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
<b>ANEXO I</b> .....	79
<b>ANEXO II</b> .....	81



# 1. Introdução

### 1.1. *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório, é o agente causador da toxoplasmose, que pertence ao filo Apicomplexa, juntamente com outros parasitos de importância humana e veterinária como *Plasmodium* ssp, *Cryptosporidium* ssp. e *Neospora* sp. (FENOY et al., 2016; MOTA et al., 2017). Representantes desse filo apresentam algumas organelas características em comum como roptrias, conóides e micronemas (**Figura 1**). As proteínas secretadas pelos micronemas participam do processo de adesão e invasão, enquanto que as roptrias e grânulos densos são importantes para modulação de processos intracelulares da célula hospedeira, essenciais para seu ciclo proliferativo (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2012). Os conóides, por sua vez, participam da mobilidade do parasito (CARRUTHERS; SIBLEY, 1999; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002).

O parasito possui três formas infectantes, sendo elas: oocistos, bradizoítos e taquizoítos; e seu ciclo reprodutivo apresenta fase sexuada e assexuada necessitando de um hospedeiro definitivo e um intermediário, respectivamente (KHADEM VATAN et al., 2017). Os felinos dos gêneros *Felix* e *Lynx* podem atuar como hospedeiros definitivos após contaminação por ingestão de cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítos, dando início ao ciclo sexuada no epitélio intestinal desses animais (ELMORE et al., 2010; DABRITZ; CONRAD, 2010; FEITOSA et al., 2017). Os humanos, e outros mamíferos e aves, são hospedeiros intermediários participando do ciclo assexuada do parasito. (DOLIWA et al., 2013).

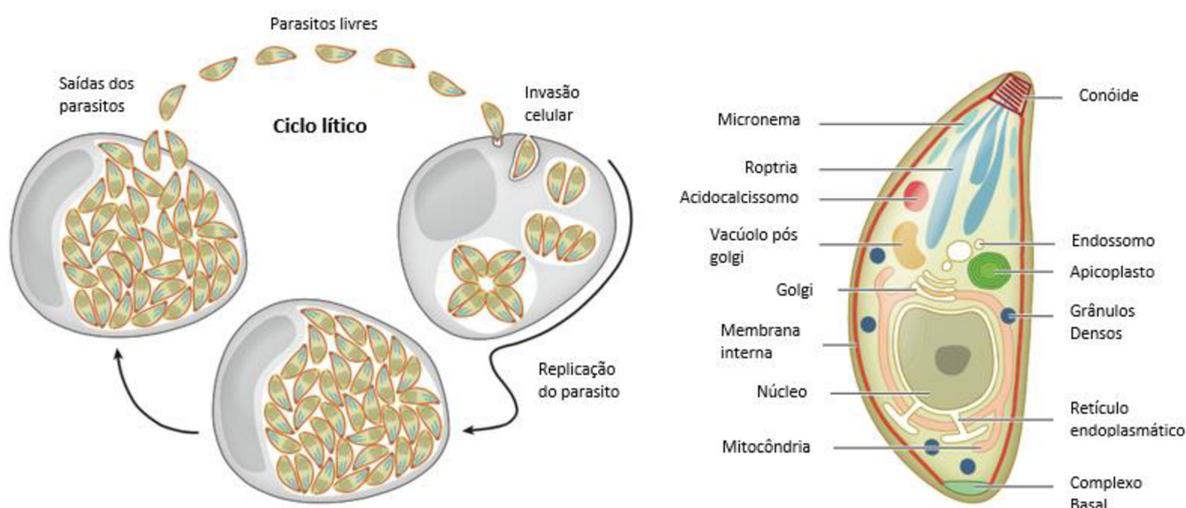
A toxoplasmose é uma doença que apresenta distribuição mundial, e sua prevalência varia de acordo com a região, podendo ser menor em alguns países (1%) até valores preocupantes em algumas regiões da Europa e América do Sul (90%) (FALLAH et al., 2018). As infecções geralmente são assintomáticas, entretanto podem ser observados sintomas clínicos semelhantes a gripe e mais recentemente, tem-se descrito alterações comportamentais no indivíduo infectado. A toxoplasmose em indivíduos imunossuprimidos e em gestantes pode apresentar consequências graves para o indivíduo ou para o feto, no caso da toxoplasmose congênita (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; HAMPTON, 2015).

#### 1.1.1. Formas infectantes

Os estudos conduzidos até os anos 70 descreviam apenas os estágios assexuados do parasito: taquizoítos e bradizoítos. O ciclo sexual nos felinos e os demais estágios de desenvolvimento foram descritos e melhor estudados após 1970 (DUBEY, 2009). Atualmente, sabe-se que o parasito apresenta um ciclo heteroxênico com fases sexuada e assexuada (AFONSO; THULLIEZ; GILOT-FROMONT, 2006).

*T. gondii* possui duas principais formas evolutivas no hospedeiro intermediário, conhecidas como: taquizoítos e bradizoítos (SKARIAH et al., 2010; FENOY et al., 2016). Os taquizoítos são a forma de replicação rápida e causadores da fase aguda da doença. Estes podem se espalhar rapidamente pelo organismo do hospedeiro se replicando em quase todos os tipos celulares (BLADER et al., 2015). A Replicação é rápida, por endodiogenia e em ciclo lítico, ocasionando a destruição da célula hospedeira ao fim do processo (**Figura 1**).

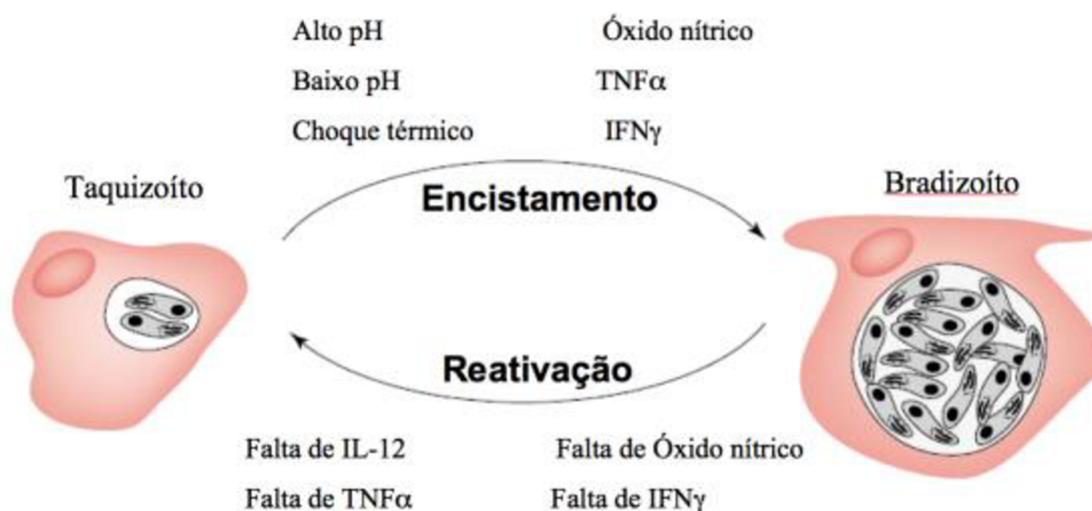
**Figura 1** – Ciclo lítico celular e estrutura de *T. gondii*



Fonte: Blader et al., 2015 (adaptado)

Os bradizoítos também apresentam replicação por endodiogenia, porém mais lenta, e formam cistos teciduais principalmente em células musculares e nervosas, caracterizando a fase crônica da doença (**Figura 2**) (WANG; YIN, 2014; FENOY et al., 2016; WOHLFERT; BLADER; WILSON, 2017). A fase crônica pode se estender por toda a vida em casos de indivíduos não imunocomprometidos (ELSHEIKHA, 2008; FENOY et al., 2016). O consumo destes cistos pode levar à transmissão do parasito aos felinos reiniciando o ciclo (BLADER et al., 2015). Já os esporozoítos (contidos dentro dos oocistos liberados nas fezes de felídeos), são as formas infectantes provenientes do processo de reprodução sexuada do parasito e podem ser encontrados no meio ambiente contaminando água, solos e alimentos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH et al., 2010; SANTANA et al., 2015; YAN et al., 2016).

**Figura 2** – Ilustração do processo de diferenciação de taquizoítos em bradizoítos de *T. gondii*



Fonte: Soares, 2010

### 1.1.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *T. gondii* inicia-se com a ingestão de cistos e/ou oocistos pelo hospedeiro intermediário. Em seguida, ocorre a degradação de suas paredes externas por ação enzimática no ambiente estomacal ou dentro de vacúolos parasitóforos, promovendo a liberação das formas infectantes, bradizoítos e esporozoítos, na luz intestinal, cerca de 6 horas após a infecção (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; BLADER et al., 2015; SKOTARCZAK, 2016). Ao entrar em contato com o epitélio intestinal, as formas infectantes iniciam o processo de invasão celular e diferenciação em taquizoítos, com rápida replicação assexuada por endodiogenia e intensa destruição celular (OVCIARIKOVA et al., 2017). Os parasitos extracelulares não apresentam a capacidade de divisão celular, entretanto, são bastante móveis e utilizam-se do complexo apical para se locomover.

A locomoção ocorre por meio do deslocamento do conóide no anel polar superior e secreção do conteúdo dos micronemas; as roptrias também possuem um papel importante nesse processo (**Figura 1**) (BLADER et al., 2015). Aproximadamente 3 dias após a infecção, os taquizoítos alcançam a circulação e podem estar presentes em qualquer célula, tecido ou fluido biológico (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; BLADER et al., 2015). Este estágio é caracterizado por fase aguda da infecção, com grande risco de transmissão congênita. O hospedeiro, então, inicia uma resposta imune visando controlar a replicação e a permanência do parasito no organismo, entretanto, o parasito utiliza-se de mecanismos para evadir da resposta imune, e desencadeia o seu processo de diferenciação de taquizoítos em bradizoítos

(DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; PITTMAN; KNOLL, 2015). Fatores como mudanças no pH, a presença de citocinas do perfil Th1 e moléculas citotóxicas liberadas pelas células do sistema imune contribuem para a geração de um ambiente desfavorável a permanência do parasito favorecendo a diferenciação dos bradizoítos e o processo de encistamento (SOARES, 2010; BLADER et al., 2015). Os bradizoítos garantem a permanência do parasita no hospedeiro, pois possuem um processo lento de replicação, e são envoltos por uma parede cística resistente, formando os cistos teciduais (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; BLADER et al., 2015). A capacidade de estabelecer cistos que podem perdurar por toda a vida do hospedeiro e o tropismo do parasito por locais imunoprivilegiados, onde recebem menos influência do sistema imunológico, são fatores determinantes para o sucesso do parasito (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; PITTMAN; KNOLL, 2015).

## **1.2. Caracterização de cepas**

Cepas do tipo I, como RH, BK e VEL, são mais virulentas em humanos e camundongos, causando maior mortalidade e doenças oculares mais graves (COMMODARO et al., 2009; DUBEY, 2016; FEITOSA et al., 2017). Cepas do tipo II, como ME-49 e M3, são predominantes em isolados de pacientes com AIDS e/ou encefalite toxoplásmica. Também se relacionam aos casos de reativação da infecção crônica em humanos e infecções congênitas (AJZENBERG et al., 2002; SIBLEY et al., 2009; DUBEY, 2016; CHAICHAN et al., 2017). Cepas do tipo III, como VEG e M-7741, estão associadas às infecções animais e causam infecções brandas e assintomáticas (KIM; WEISS, 2004; SIBLEY et al., 2009; DUBEY, 2016; CHAICHAN et al., 2017).

Em diferentes regiões do mundo já foram identificadas linhagem não-clonais da classificação atual. Estas cepas ditas “atípicas” ou recombinantes causam sintomas mais graves e podem ser encontradas principalmente na América do Sul. (PITTMAN; KNOLL, 2015; XIAO; YOLKEN, 2015). Para a genotipagem dos isolados de *T. gondii*, a maioria dos estudos utilizam a técnica da PCR-RFLP (polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição) (AJZENBERG et al., 2005; PENA et al., 2008; SOARES et al., 2011; SU et al., 2012). Nas análises de isolados oriundos de várias regiões do mundo, além de Europa e Estados Unidos, observou-se uma alta porcentagem de genótipos atípicos ou recombinantes, sugerindo que a população de *T. gondii* seria altamente diversa nessas regiões (DUBEY et al., 2007b; SIBLEY; AJIOKA, 2008; SU et al., 2012; SHWAB et al. 2014). Os resultados corroboram com os dados

apresentados por Dubey e colaboradores (2007a), onde as cepas de *T. gondii* encontradas no Brasil e na Colômbia são mais patogênicas e biológica e geneticamente diferentes daquelas da América do Norte.

Vários estudos de genotipagem foram realizados em isolados de origem animal e humano no Brasil (PENA et al., 2008; DUBEY et al., 2010; SOARES et al., 2011; FRAZÃO-TEXEIRA et al., 2011; PENA et al., 2011), e todos eles apresentaram resultados semelhantes mostrando alta diversidade genotípica dos isolados brasileiros. Acredita-se que a amplitude geográfica e a grande biodiversidade da fauna do Brasil possam contribuir para essa maior variabilidade genética das cepas brasileiras de *T. gondii* (DARDÉ, 2008; KHAN et al., 2009).

Um estudo realizado em Uberlândia, Minas Gerais, conseguiu o isolamento de duas cepas em amostras de coração de galinhas, denominados TgChBrUD1 (UDI-1) e TgChBrUD2 (UDI-2). A genotipagem desses isolados mostrou que TgChBrUD1 pertence ao tipo BrII (genótipo #11 no ToxoDB PCR-RFLP) e TgChBrUD2 ao tipo BrI (genótipo #6 no ToxoDB PCR-RFLP) (LOPES et al., 2016). Na genotipagem, observou-se que os isolados são o resultado de recombinações genéticas das três linhagens clonais de *T. gondii* e ainda possuem alelos não comuns às cepas tradicionais do parasito. Enquanto UDI-1 possui cinco marcadores genéticos da cepa tipo I, dois para tipo II e cinco para tipo III; UDI-2 apresenta nove marcadores para o tipo I, um para tipo II e um para tipo III, além de um alelo atípico daqueles encontrados nos tipos I, II e III do parasito, denominado c22-8 (LOPES et al., 2016). Os isolados ainda diferem no tempo de replicação. Parasitos UDI-1 replicam mais lentamente no interior de células fibroblásticas da linhagem HFF, enquanto os parasitos UDI-2 são capazes de replicar e romper as células hospedeiras em menor intervalo de tempo. A infecção *in vivo*, utilizando modelos experimentais em roedores, resultou em baixa taxa de sobrevivência dos animais, o que demonstra semelhanças de ambas as cepas brasileiras com as cepas virulentas de *T. gondii* (LOPES et al., 2016). Além disso, existem diferenças na capacidade de indução de morte celular por apoptose, além da susceptibilidade e indução de resposta imune, indicando possíveis graus diferenciados de virulência entre os parasitos das cepas UDI-1 e UDI-2 obtidas após infecção experimental de *Callomys callosus* ou de parasitos mantidos apenas em cultura celular (LOPES-MARIA et al., 2013).

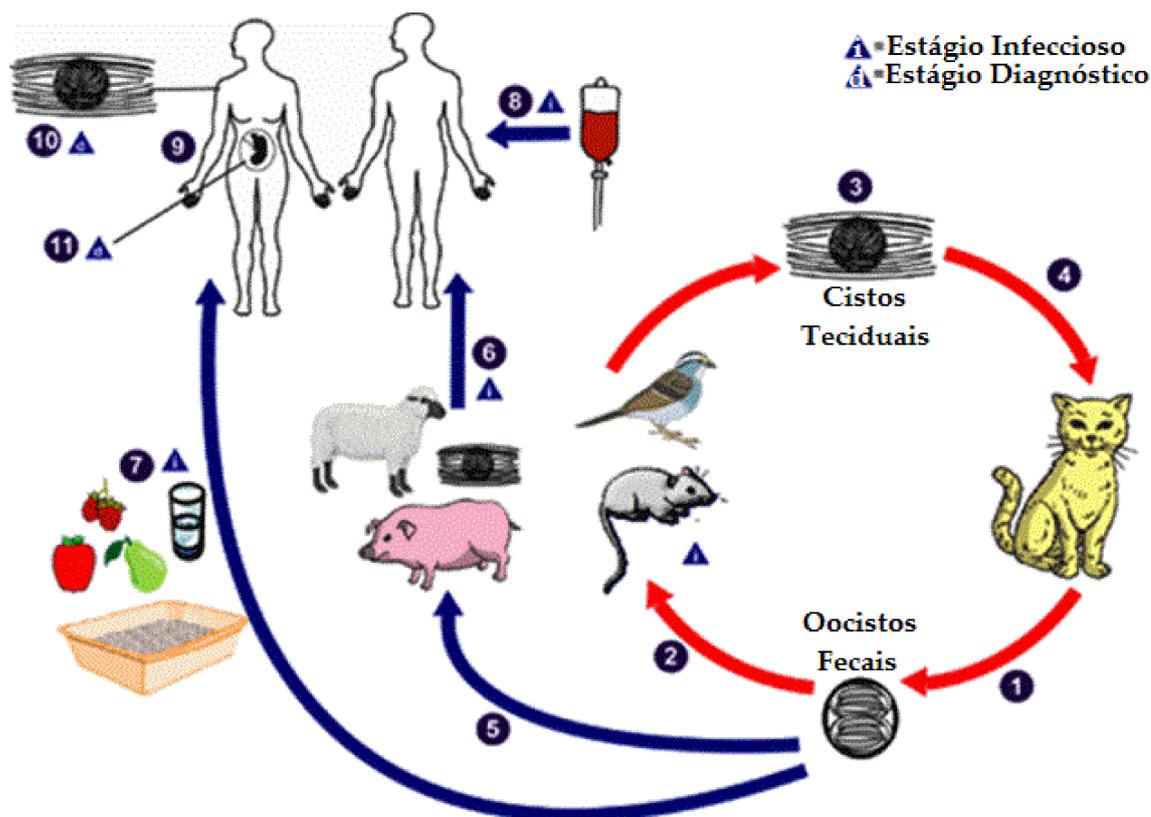
Em um recente estudo epidemiológico, durante um surto de toxoplasmose ocorrido em Santa Maria, Rio Grande do Sul, em 2018, foi realizado o isolamento e a genotipagem de parasitos encontrados em amostras de placenta gestantes que abortaram ou tiveram perda fetal (MARTINS et al., 2018). Os resultados mostraram que os isolados destas amostras

apresentavam padrões de clivagem idênticos e foram consideradas atípicas, uma vez que não possuíam um padrão semelhante a nenhum dos três tipos clonais descritos na literatura (MARTINS et al., 2018). Estudos *in vivo* utilizando camundongos Swiss foram realizados e observou-se uma alta virulência desta cepa, sendo a sua virulência comparada a da cepa RH (NINO et al., 2018).

### 1.3. A Toxoplasmose

Estima-se que 1/3 da população mundial esteja acometida pela toxoplasmose de forma assintomática. O ciclo assexuado da toxoplasmose acomete cerca de 80 a 90% das pessoas imunocompetentes, onde cerca de 10% apresentam sintomas inespecíficos e não necessitam de tratamento (MUMCUOĞLU et al., 2014; SANDERS et al., 2017). Entretanto, as formas mais graves da doença são vistas em indivíduos imunocomprometidos e em recém-nascidos (RN) de gestantes infectadas durante o período gestacional (FABIANI et al., 2015; FEITOSA et al.,

**Figura 3** – Ciclo e formas de contaminação por *T. gondii*



Fonte: CDC 2018

2017). A forma mais comum de transmissão é a ingestão de oocistos liberados nas fezes dos felinos que podem contaminar o solo, frutas e vegetais. Outras formas incluem a ingestão de cistos em carne malcozida e a transmissão vertical durante a passagem dos taquizoítos pela placenta, acarretando em sérias complicações fetais que podem levar a óbito (**Figura 3**) (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; FEITOSA et al., 2017; SMIT et al., 2017).

A infecção segue em dois estágios. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia da forma taquizoíto do parasito. Em seguida, na fase crônica, a parasitemia entra em latência e os parasitos invadem as células se multiplicando na forma de bradizoítos dentro de cistos teciduais que podem permanecer viáveis durante toda a vida do hospedeiro (FENOY et al., 2016; MOSE et al., 2017). Durante a infecção, o parasito é capaz de penetrar nas células migratórias do sistema imune, como monócitos, linfócitos e células dendríticas, sendo disseminado pelo organismo e alcançando outros tecidos (LAMBERT et al., 2006; MOSE et al., 2017; SIBLEY et al., 2011). No cérebro, região de imunoprivilégio, as complicações compreendem disfunções neurológicas, encefalites e coriorretinites (FENOY et al., 2016; GASHOUT et al., 2016; MOSE et al., 2017; ASSOLINI et al., 2017; FUGLEWICZ; PIOTROWSKI; STODOLAK, 2017).

### **1.3.1. Toxoplasmose ocular**

Uma das formas mais comuns de apresentação da toxoplasmose é o comprometimento ocular. A condição pode acontecer durante a fase aguda da infecção ou anos após o período de encistamento dos bradizoítos (ORÉFICE et al., 2010), o que torna difícil distinguir o diagnóstico da toxoplasmose ocular da infecção congênita de aparecimento tardio. Estima-se uma prevalência de 30% em todos os casos de toxoplasmose ocular sejam por toxoplasmose congênita, assim é provável que a infecção adquirida tenha mais casos clínicos do que a forma congênita (GARWEG, 2016). O diagnóstico clínico pode ser prejudicado devido ao fato das lesões passarem despercebidas em alguns casos (BOSCH-DRIESSEN; ROTHOVA, 1999).

### **1.3.2. Toxoplasmose congênita**

A toxoplasmose congênita pode ocorrer em gestantes infectadas no início ou durante a gestação (POMARES; MONTOYA, 2016). Neste período, os taquizoítos, ainda livres na circulação, podem alcançar a barreira placentária, transpassá-la e ganhar acesso à circulação e

tecidos fetais ainda imaturos. Desta forma, o parasito se encontra livre para continuar seu ciclo intrauterino podendo causar sérios comprometimentos ao feto (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; KODJIKIAN, 2010; POMARES; MONTOYA, 2016).

Outra forma de transmissão pode ocorrer em casos de reagudização de infecção crônica materna causada por alguma disfunção imunológica, o que pode levar à transmissão transplacentária (HAMPTON, 2015; KODJIKIAN, 2010). Alguns estudos relatam que a gestante com infecção crônica e imunocompetente apresenta pequeno risco de transmitir a infecção para o feto (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009; VALDÈS et al., 2011; HAMPTON, 2015). Em casos que a gestante possui cistos no endométrio, pode ocorrer rompimento destes por distensão mecânica ou ação lítica das vilosidades coriônicas, dessa forma os bradizoítos são liberados e alcançam os tecidos fetais (KAWAZOE, 2005). Além disto, alguns estudos também relatam que a imunidade adquirida em uma primeira infecção não seja suficiente para evitar reinfeção por diferentes cepas de *T. gondii* (ARAUJO; SLIFER; KIM, 1997; DAO et al., 2001; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

As principais consequências que caracterizam uma infecção congênita são: microcefalia, hidrocefalia, calcificação intracranial e coriorretinite, além de retardamento mental e psicomotor. A maioria dos RN infectados nascem assintomáticos para a doença, podendo apresentar sequelas mais tardiamente, principalmente durante da puberdade (JONES et al., 2009; BLANCO-LAGO et al., 2010). Cerca de 20 a 50% dos casos de primo-infecção materna humana resultam em comprometimento fetal. A probabilidade de transmissão fetal também pode variar de acordo com o período de infecção. Quando a primo infecção materna ocorre no período pré-concepção há 1% de chance de transmissão (ROBERT-GANGNEUX and DARDÉ, 2012). Caso a gestante adquira a infecção no primeiro ou segundo trimestre gestacional, a possibilidade de transmissão vertical sobe para 10-20% e o comprometimento fetal pode ser mais grave levando até mesmo ao aborto. Se a infecção ocorrer no terceiro trimestre, a possibilidade da infecção fetal é de 60-90%, mas as chances de comprometimento fetal são menores (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; KODJIKIAN, 2010; POMARES; MONTOYA, 2016).

### **1.3.3. Diagnóstico**

A fim de reduzir os riscos de infecção congênita, é de suma importância que o diagnóstico seja acurado e sensível e que a infecção seja detectada cedo (HAMPTON, 2015).

Apesar de ser assintomática, a toxoplasmose pode apresentar alguns sinais clínicos em adultos e crianças imunocomprometidos semelhantes a mononucleose infecciosa, sendo diagnosticada por anamnese (FRENKEL, 2002). O diagnóstico laboratorial inclui a obtenção de amostras biológicas como sangue e líquido amniótico (LA). A reatividade da resposta imune do hospedeiro contra o parasito pode ser detectada, aproximadamente, duas semanas após a infecção com os anticorpos IgG, IgM e IgA no soro. (MINEO et al., 1993).

O diagnóstico sorológico é comumente realizado no início do pré-natal. Os títulos de IgG e IgM devem ser cuidadosamente analisados. A presença de altos títulos de IgM pode indicar uma infecção recente. A ausência de IgG com a presença de IgM é também um forte indício de infecção aguda (HAMPTON, 2015). Caso confirmada a presença de IgG anti-*T. gondii* também pode ser realizado o teste de avidéz de IgG. Este teste pode determinar o provável período de infecção materna baseado na maturação da imunoglobulina G, assim, a presença de anticorpos de baixa avidéz, pouco maturados, indica uma possível infecção recente e pode ser correlacionado com o risco de infecção congênita. Em casos de suspeita de primo infecção materna, é recomendado a coleta de LA para a detecção do DNA do parasito por PCR. Os alvos de amplificação comumente escolhidos são o gene B1 e o gene P30 (BUCHINDER; BLATZ; RODLOFF, 2003; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOY, 2004; SKOTARCZAK, 2016). Além do LA também podem ser utilizadas amostra de sangue, líquido, humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar e até urina para o diagnostico (KHALIFA et al., 1994).

O diagnóstico final confirmatório inclui o uso do ultrassom, recomendado para gestantes com alto risco de TC (HAMPTON, 2015). O diagnóstico por imagem pode mostrar anormalidades no desenvolvimento neuronal, relacionadas a infecção. Dentre as complicações que podem ser reveladas no teste estão: hidrocefalia, ventriculomegalia e calcificações intracerebral. Outros sinais como esplenomegalia, nefrose congênita e ascite também podem ser detectados e relacionados à TC (HAMPTON, 2015).

Após o nascimento é necessário acompanhar a soroconversão da criança, os anticorpos maternos ainda persistem no sangue do RN por até um ano. A detecção destes anticorpos em títulos constantes ou crescentes indica a infecção da criança, uma vez que os níveis provenientes da mãe tendem a decrescer com o tempo (BOYER et al., 1998). Um problema encontrado no diagnóstico sorológico da toxoplasmose é a presença de anticorpos IgM residuais, o que não necessariamente, indicam uma infecção aguda (PETERSEN, 2007).

#### **1.3.4. Tratamento e prevenção**

Segundo a organização mundial da saúde, a espiramicina é a droga de escolha para gestantes com alto risco de TC (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ELSHEIKHA, 2008; ROBERT-GANGNEUX and DARDÉ, 2012; CDC, 2018). Após a confirmação da infecção fetal o tratamento muda para uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina (PSA) associadas ao ácido folínico (RORMAN et al., 2006). O uso do PSA também é utilizado em casos de toxoplasmose ocular, juntamente com corticosteroides para impedir a parasitemia e a remoção cirúrgica dos cistos se necessário (ORÉFICE et al., 2010). Outra droga em estudo para o tratamento da toxoplasmose congênita, testada em murinos, linhagens celulares e explantes placentários, é a azitromicina, a qual apresenta atividade inibitória prolongada sobre a replicação intracelular de taquizoítos e uma menor toxicidade (GILMAN, 1997; MONTROYA; LIESENFELD, 2004; FRANCO et al., 2011; CASTRO-FILICE et al., 2014). Entretanto, apesar da existência do tratamento para a toxoplasmose congênita há quase trinta anos, não se sabe ao certo a real eficiência do mesmo, e também qual o real mecanismo de ação dos fármacos nas mulheres e nos fetos (PINARD et al., 2003; ELSHEIKHA, 2008).

A prevenção da TC pode ser dividida em primária, secundária e terciária. Os programas de educação e saúde pública compõem a prevenção primária (FOULON, 1992). É recomendando, principalmente às gestantes, que evitem contato com materiais potencialmente contaminados, como carnes cruas, frutas e verduras com higienização deficiente e caixas de areia com dejetos de gatos (BOJAR; SZYMAŃSKA, 2010). A prevenção secundária reside em evitar a transmissão materno-fetal por meio de um diagnóstico apurado e o tratamento preventivo (FOULON; NAESSENS; DERDE, 1994). Já a prevenção terciária recomenda o acompanhamento sorológico do bebê e os esforços em evitar o aparecimento de sequelas consequentes da transmissão congênita (HALL, 1992).

### **1.3.5. Importância do LA na transmissão e diagnóstico da toxoplasmose**

O LA é o fluido protetivo responsável por auxiliar o desenvolvimento fetal dentro da bolsa amniótica. Dentre as suas funções, ele evita a compressão da medula por proporcionar um ambiente livre de choques mecânicos e mantém a temperatura adequada. Ainda, ele proporciona uma barreira imunológica que auxilia no combate a patógenos (GOMEZ-LOPEZ et al., 2018). O LA também auxilia no desenvolvimento normal dos sistemas esquelético, muscular, pulmonar e gastrointestinal do feto (DOBREVA, 2010).

Seu volume é variável, mas tende a aumentar muito até a metade do terceiro trimestre de gravidez e, então, começa a declinar (MUSSAP et al., 1996; PERNI et al., 2004). Ele é composto de vários tipos celulares, mas principalmente amniócitos e células dos tecidos expostos do feto, como pele e pulmões, e dos fluidos produzidos por este. Além disso, são encontradas proteínas e citocinas que atravessam a placenta. É também uma fonte de células tronco. O LA pode ser coletado durante a gravidez durante procedimentos de amniocentese e cirurgias cesarianas (ROSSI et al., 2014; RAMACHANDRA et al., 2014).

No primeiro e segundo trimestre da gestação o cório e o cordão umbilical são a principal fonte de fluidos que dará volume ao LA. Do cordão vêm fluidos provenientes do soro materno. Nesta fase, o LA representa uma extensão do compartimento de fluido extracelular fetal (GOMEZ-LOPEZ et al., 2018). Entretanto, ao alcançar o desenvolvimento renal completo no terceiro trimestre, o feto passa a eliminar urina dentro da bolsa amniótica contribuindo para o volume final. Já o número de células varia de 10 a 1000 células por  $\mu\text{l}$ , dentre elas podem ser encontrados um baixo número de células imunes como macrófagos, neutrófilos e até linfócitos (ZWEMER; BIANCHI, 2015; GOMEZ-LOPEZ et al., 2018). Também já foi reportado que a concentração de componentes solúveis presente no LA excede às encontradas no soro materno, sugerindo que a principal fonte de produção e excreção é fetal. Dentre estas substâncias, podem ser encontradas carboidratos, peptídeos, proteínas, lipídios, lactato, piruvato, eletrólitos, enzimas e hormônios, entre outros, muitos responsáveis também pela defesa do feto contra patógenos. Isto faz do LA um material rico em células e substrato proteico (PRUSA; HENGSTSCHLÄGER, 2002; PERNI et al., 2004; ZWEMER; BIANCHI, 2015). O conjunto de células e moléculas descritas e encontrado no LA podem ser utilizadas como marcadores para averiguação da homeostasia gestacional (MUSSAP et al., 1996).

Por ser um ambiente tão propício a instalação e transmissão vertical, parasitos podem passar para o LA seguindo uma infecção derivada da placenta nas membranas amnióticas. Como o neonato possui um contato direto com o LA, e o absorve constantemente, está sujeito a infecções (de OLIVEIRA AZEVEDO et al., 2016). Para alguns parasitos esta rota adicional parece não ser relevante já que eles não são muito encontrados no LA. Todavia, é uma rota determinante para o *T. gondii* que é frequentemente detectado neste ambiente (CARLIER et al., 2011). Por este motivo, o LA é utilizado no diagnóstico pré-natal em casos de infecção por *T. gondii* na 16ª semana de gestação, ou quatro semanas após a infecção materna (MUSSAP et al., 1996). É mais comum o uso de PCR para detecção do parasito, entretanto, na maior parte dos centros de referência em diagnóstico, o LA também é inoculado em camundongos para a

detecção de anticorpos de 4 a 6 semanas após o ensaio. Devido ao longo tempo de espera e a baixa sensibilidade, se comparada a PCR, este método é mais destinado a isolamento de cepa (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

#### **1.4. Imunidade relacionada a infecção por *T. gondii***

##### **1.4.1. Imunidade Celular**

No curso da infecção, o sistema imune é ativado durante a penetração do parasito no epitélio intestinal com alta estimulação da resposta do tipo Th1 (BRAUN et al., 2013; JONES; KORCSMAROS; CARDING, 2017). Os danos causados pela entrada de *T. gondii* acionam as células da imunidade inata que fazem o reconhecimento do patógeno através dos receptores do tipo *Toll-like*. Este reconhecimento promove a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IFN- $\gamma$ , essenciais para o controle da infecção. Dentre as funções destas citocinas estão a ativação de macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos *natural killer* (YAROVINSKY, 2014). Os macrófagos, por sua vez, são responsáveis pela produção de óxido nítrico, desempenhando ação tóxica contra o parasito (CHING, 2016; JONES; KORCSMAROS; CARDING, 2017). *T. gondii* produz proteínas, tais como proteína 1 e lipoxina A<sub>4</sub>, para induzir uma resposta supressora, promovendo uma relação parasito-hospedeiro estável (JONES; KORCSMAROS; CARDING, 2017).

Além destas citocinas, o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) possui diversas funções importantes na indução da resposta contra patógenos e pode ser produzido por diversos tipos celulares. MIF favorece a resposta imune contra *T. gondii* pela indução da síntese de proteínas pró-inflamatórias IL-12 e IFN- $\gamma$ , essenciais no controle da infecção. Ainda, MIF possui um papel importante mantendo macrófagos ativados e está relacionado com a morte de parasitos intracelulares (CALANDRA, et al., 1995; BERNHAGEN et al., 1998; FERRO et al., 2008; RUIZ-ROSADO et al., 2016; YUKITAKE; TAKIZAWA; KIMURA, 2017).

##### **1.4.2. Imunidade Humoral**

A infecção é capaz de induzir a produção de altas quantidades de anticorpos no sangue, e intestino. Estes anticorpos desempenham um papel importante no controle da infecção por *T. gondii*, além de serem bons marcadores para o estabelecimento do diagnóstico sorológico para

a doença (PETERSEN, 2007; SERRANTI et al, 2011). A ativação de linfócitos B é dependente da participação de linfócitos T CD4+ através da sinalização direta por receptores de superfície, como CD40, e por liberação de citocinas como a IL-4 (TOELLNER et al., 1998). Esta ativação leva a produção de cinco isotipos de anticorpos pelas células B: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2015).

Anticorpos IgM são os primeiros anticorpos produzidos sendo encontrados uma semana após a infecção, alcançando títulos máximos em poucas semanas e declinando gradualmente. A infecção via oral, em alguns hospedeiros, pode induzir a formação de anticorpos IgA juntamente com as IgM. Entretanto, a IgA atinge títulos maiores e persiste por 3 a 4 meses no hospedeiro (DE PASCHALE et al., 2008; VILLARD et al., 2016). Anticorpos IgG usualmente são produzidos uma a duas semanas após a infecção alcançando títulos máximos em seis semanas, podendo declinar em alguns meses ou anos, com títulos baixos permanecendo por toda a vida (ELSHEIKHA, 2008; TALABANI et al., 2010; VILLARD et al., 2016).

Uma vez estabelecida a resposta específica contra *T. gondii* a produção de anticorpos é relativamente rápida e intensa, com altos títulos de IgG e IgM frente a uma reinfeção (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). Já foi descrito que a síntese de anticorpos se dava de forma constante, proporcional a exposição aos antígenos do parasito, e esta exposição poderia ser tanto pela constante presença dos cistos teciduais como por reinfeções, independentemente da cepa (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). Os anticorpos são responsáveis, desta forma, pela proteção contra as formas extracelulares do parasito (VILLARD et al., 2016). Interessantemente, durante o período gestacional, ocorre uma maior síntese de anticorpos não citotóxicos consequente dos altos níveis de progesterona (DRUCKMANN; DRUCKMANN, 2005).

## *2. Justificativa*

A infecção por *T. gondii*, acomete cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo e apesar da baixa ocorrência de sintomas, grupos de risco como gestantes e pessoas imunocomprometidas podem apresentar consequências graves da doença. Além disto, gestantes infectadas durante a gravidez expõem o feto a graves complicações que podem levar a óbito. É estimado que de 1-8 gestantes em 1000 sejam expostas ao protozoário. Dentre as complicações, o recém-nascido pode apresentar microcefalia, hidrocefalia e cegueira, prejudicando sua qualidade de vida e promovendo um impacto socioeconômico relevante (MIZANI et al., 2017; SMIT et al., 2017).

Alguns estudos em modelo animal demonstraram que a imunidade adquirida por uma primeira infecção é ineficaz contra uma reinfeção por diferentes cepas de *T. gondii* (DAO et al., 2001; ARAUJO; SLIFER; KIM, 1997). Elbez-Rubinstein e colaboradores (2009) publicaram um relato de caso onde uma paciente previamente imunizada apresentou TC, comprovando os dados já demonstrados em modelo experimental (FRANCO et al., 2015).

Desta forma, considerando a importância da resposta imune humoral durante a gestação, uma melhor compreensão do perfil de reconhecimento dos anticorpos maternos presentes no líquido amniótico contra cepas distintas torna-se necessário, assim como a participação desses anticorpos na proteção fetal, em especial nos casos de reinfeção.

### 3. Objetivos

### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a reatividade de anticorpos presentes em amostras de LA humano quanto ao reconhecimento de extrato antigênico solúvel de diferentes cepas de *T. gondii*.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Conferir as informações clínicas presentes nos prontuários das gestantes sobre o tratamento e controle da infecção fetal;
- Verificar a presença de anticorpos nas amostras de LA;
- Analisar o perfil proteico dos extratos de diferentes cepas de *T. gondii*;
- Avaliar as diferenças entre o perfil de reconhecimento antigênico dos anticorpos presentes no LA frente a diferentes cepas de *T. gondii*;
- Determinar a avidéz de IgG em amostras de LA suspeitas de fase aguda utilizando STAg de diferentes cepas.

## 4. Metodologia

#### **4.1. Considerações éticas**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob protocolo número 1.289.995 (ANEXO I). Um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (ANEXO II) assinado foi obtido de cada gestante antes da coleta da amostra após deixá-las cientes de todos os procedimentos envolvidos, em obediência às Resoluções nº CNS 347/05 e CNS 196/96 do Ministério da Saúde.

#### **4.2. Amostras de LA e análise de prontuários**

As amostras foram obtidas de trinta e três gestantes soropositivas diagnosticadas sob alto risco de TC, com base em testes sorológicos (IgM, IgG e avidéz de IgG) no Hospital das Clínicas da UFU (HC-UFU) em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, submetidas a amniocentese por uma médica profissional. Todas as pacientes foram tratadas (Tabela 1). O procedimento foi realizado quatro semanas após a diagnóstico sorológico e cerca de 9 mL de LA foram coletados. O presente estudo utilizou remanescentes de LA, material que seria descartado das amostras coletadas para diagnóstico da TC. Assim que recebidas, as amostras foram centrifugadas para a coleta do sobrenadante que foi utilizado para análise de anticorpos. Como controle, três amostras de LA coletadas de parto cesárea de mães soronegativas foram coletadas.

Todas as informações clínicas das pacientes foram obtidas de seus prontuários médicos no Setor de Arquivos Médicos do HC-UFU, após consentimento (ANEXO II). Foram pesquisadas as seguintes informações nos prontuários: (1) Resultados de exames sorológicos; (2) Resultados dos exames de PCR no LA; (3) Tratamento utilizado durante a gestação relacionado à toxoplasmose.

#### **4.3. Manutenção das cepas e preparo de antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg)**

As cepas de *T. gondii* RH, ME-49, TgChBrUD1, TgChBrUD2 e um novo isolado de humano proveniente de um surto ocorrido em Santa Maria, sul do Brasil, foram cultivadas para este estudo. Taquizoítos de cada cepa foram mantidos por passagem serial em cultura de células HeLa por 48 a 72h. As monocamadas de células HeLa foram mantidas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> e 75cm<sup>2</sup> a 37°C com 5% CO<sup>2</sup> em meio RPMI 1640 contendo 2mM glutamina (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab) penicilina/estreptomicina (50U ou µg/ ml)). Os taquizoítas

de *T. gondii* foram mantidos em monocamadas de células HeLa a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> com meio RPMI 1640 incompleto, glutamina (2mM) e antibiótico/antimicótico (Gibco-100 unid/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina). A medida que a maioria das células infectadas em cultura encontraram-se lisadas pelos parasitos, o meio do frasco contendo taquizoítas livres foi transferido para um tubo de 15ml, centrifugado a 720 x g por cinco minutos em temperatura ambiente. O pellet foi armazenado a -20 °C para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

O STAg de cada cepa foi preparado como descrito por Carvalho e colaboradores (2008), com algumas modificações. Suspensões parasitárias ( $1 \times 10^8$  taquizoítas/mL) foram tratadas com coquetel de inibidores de proteases (*Complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack*, Penzberg, Bavaria, Alemanha) e, então, submetidas a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C, seguido por dois ciclos de ultrassom a 60 Hz, em banho de gelo, em sonicador (*Sonopuls mini20 Ultrasonic Homogenizer*, Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlim, Alemanha), sendo cada ciclo com duração de 5 minutos, com pulsos de 30 segundos e intervalo de 10 segundos entre eles. Após centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi coletado, a concentração proteica foi determinada por absorbância no NanoDrop (*ND1000 Spectrophotometer*). Alíquotas dos antígenos foram armazenadas a -20 °C até a utilização.

#### **4.4. Análise de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos (ELISA)**

Para a pesquisa de anticorpos IgG total anti-*T. gondii* nas amostras de LA foi utilizado o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). Brevemente, placas de microtitulação de alta afinidade (*Corning Laboratories 3590 inc.*, New York, EUA) foram sensibilizadas com uma solução de STAg (cepa RH) (10 µg/mL) em tampão bicarbonato de sódio a 0,06M (pH 9,6) por 18 horas a 4 °C. A seguir foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos da microplaca pela adição de 150 µl de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM) (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) (PBS-TM) por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras de LA em duplicadas (50 µl), diluídas a 1:64 em 1% PBS-TM, foram adicionadas à microplaca. Paralelamente, as amostras de LA controles, nas mesmas diluições, foram incluídos na análise. Após incubação por 1 hora a 37 °C, foi adicionado o anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA) diluídos na razão 1:2000 em PBS-TM, e a placa foi incubada por 1 hora

a 37 °C. Entre cada etapa da reação foram realizados ciclos de lavagem com PBS-T para a retirada do excesso de reagentes. A reação foi revelada pela adição das soluções A e B (v/v) do kit comercial contendo substrato enzimático H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o cromógeno 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico (ABTS) (*ABTS Peroxidase Substrate System*; KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA).

A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em uma leitora de microplacas (*SpectraMax® M2 Systems*; *Molecular Devices*, LLC, San Jose, CA, USA). O limite de positividade (cut off) da reação foi determinado pela média da DO dos controles negativos. Os resultados foram expressos em DO.

#### **4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio SDS-PAGE e obtenção das membranas contendo os STAg**

Cada amostra de STAg das cinco diferentes cepas foram previamente solubilizadas em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%), aquecidos a 95°C durante 5 minutos e, então, submetidas a eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, com gel de empilhamento a 5%, em condições desnaturantes e não redutoras (10 µl/banda). A corrida foi realizada utilizando-se o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (*Hoefer Pharmacia biotech Inc.*, São Francisco, CA, EUA), sob corrente constante de 26 mA por, aproximadamente, 1 hora. Em um poço paralelo às amostras foi aplicado 5 µl do marcador de peso molecular para identificação das bandas proteicas (Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard, Invitrogen™, USA). O gel foi corado com solução azul brilhante de Coomassie (0,05%) e as frações de cada amostra foram determinadas e avaliadas no ChemiDoc Imagers (*ChemiDoc™ Imaging Systems*, Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA). Além disso, aproximadamente 150 µg de cada STAg foi corrido separadamente em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% de nas mesmas condições e eletrotransferido para membranas de nitrocelulose com poros de 0,22 µm (*Sigma-Aldrich chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA) utilizando-se de um sistema semi-úmido de transferência (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*, BIO RAD, Laboratories, Hercules, CA, USA) por 30 minutos a uma corrente constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> do gel para ensaios de imunoblotting. A eficiência da transferência foi confirmada pela coloração das membranas com solução de Ponceau a 0,5%.

#### **4.6. Immunoblotting (IB) para caracterização antigênica das frações de STAg das cinco cepas de *T. gondii***

Os IB foram realizados para avaliar a especificidade e o padrão de reconhecimento dos anticorpos anti-*T. gondii* presentes nas amostras de LA contra os cinco STAg das cepas estudadas. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose contendo os diferentes STAg foram cortadas em tiras de aproximadamente 3mm de largura com o auxílio de um bisturi. Em seguida, as tiras de nitrocelulose de cada cepa foram bloqueadas com solução de PBS-T suplementada com leite desnatado a 5% (PBS-TM) (2h a 37°C, sob agitação lenta), e após as lavagens, incubadas com amostras de LA diluídas 1:25 em PBS-TM a 1% *overnight* a 4°C sob agitação lenta. As amostras de LA controle também foram incluídas na reação. O complexo proteína-anticorpo foi detectado por incubação com anticorpos secundários de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA) diluído 1:2000 em PBS-TM a 1% (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA) durante 2 h à temperatura ambiente. As reações foram reveladas pela adição de diaminobenzidina (DAB Estável, Invitrogen) e paradas com água destilada. O peso molecular (KDa) para cada fração antigênica foi determinado utilizando os Imagers ChemiDoc (*Sistemas de Imaging ChemiDoc™*, *Bio-Rad*, Laboratories, Hercules CA). Para análises, uma banda foi considerada reativa a uma preparação STAg de uma cepa quando reagiu com pelo menos 50% das amostras de LA.

#### **4.7. Immunoblot-avidez para anticorpos IgG anti-*T. gondii***

Para este ensaio foram utilizadas as amostras de LA de pacientes suspeitas de fase aguda, segundo as informações sorológicas obtidas nos prontuários. A determinação de fase aguda e crônica foi realizada conforme descrito por Findal e colaboradores (2015). Foi considerado em fase aguda as pacientes que apresentaram IgM+/IgG- ou presença de IgG baixa avidez e em fase crônica quando moderada ou alta avidez de IgG. O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.6, com algumas modificações. A incubação das tiras com amostras de LA foi realizada em duplicata por 18 h a 4 °C. Após lavagens, uma tira foi lavada com PBS-T (ureia-) e a outra lavada com PBS-T contendo 6 M de ureia (ureia+) por 10 min. Após a revelação, as intensidades de banda (Int Band) obtidas para cada fração antigênica foram avaliadas usando Imagers ChemiDoc (*ChemiDoc™ Imaging Systems*, *Bio-Rad*, Laboratories, Hercules CA). Os resultados para tiras de ureia - ou ureia + foram expressos em índice de avidez

(IA), em que  $AI = (\text{uréia} + \text{Banda Int} / \text{ureia} - \text{Banda Int}) \times 100$ . AI <30% correspondeu à reatividade com anticorpos de baixa avidéz, IA entre 30 e 75% corresponderam à reatividade com anticorpos de avidéz moderada e AI > 75% à reatividade com anticorpos de alta avidéz (OLIVEIRA, 2013).

#### **4.8. Análise estatística**

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism, versão 6.0 (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, EUA). Os dados foram expressos como mediana com erro padrão médio dos grupos experimentais. As diferenças entre os grupos na análise de anticorpos foram analisadas por Mann-Whitney não paramétrico. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $P < 0,05$ .

## 5. Resultados

Os prontuários das 33 gestantes relatadas com alto risco de TC foram avaliados para coleta de informações sobre sorologia, medicações do paciente e resultados de PCR para detecção do DNA de *T. gondii* no LA (**Tabela 1**).

Dentre as 33 mulheres avaliadas, 20 gestantes apresentavam moderada ou alta avidéz de IgG, enquanto cinco possuíam baixa avidéz de IgG e uma foi negativa para IgG. Outras sete não possuíam essa informação relatada no prontuário (**Tabela 1**). Foi encontrado DNA de *T. gondii* por PCR em apenas uma das amostras, desta forma esta paciente foi tratada com a combinação de pirimetamina e sulfadiazina até o parto. Com finalidade de evitar a transmissão materno-fetal, as 32 gestantes com suspeita de infecção por *T. gondii* foram tratadas com espiramicina durante a gravidez. Nenhum caso de TC foi relatado nos prontuários (**Tabela 1**).

Com base nos resultados sorológicos do teste de avidéz de IgG e na ausência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* observado nos prontuários (**Tabela 1**), as pacientes foram divididos em três grupos: (a) fase aguda de infecção (n = 6), baixa avidéz ou IgG negativo, (b) fase crônica de infecção (n = 20), moderada ou alta avidéz, e (c) aqueles com informação desconhecida (n = 7). Uma vez que essas mulheres foram diagnosticadas com alto risco de TC, foi realizada a investigação da presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas amostras de LA por ELISA e 32 amostras foram positivas, enquanto a amostra A28 ficou no limite de detecção (**Figura 4A**). Curiosamente, na análise dos prontuários, a amostra A28 também apresentava IgG anti-*T. gondii* negativa para a amostra de soro. Assim, foi aplicado o IB em caráter confirmatório na amostra, e apenas foi possível detectar bandas fracas com os STAg das cepas UDI-1, RH e Santa Maria (**Figura 4B**), o que pode ser um indicador de fase aguda da infecção ou falso-positivo. Por esse motivo, a amostra A28 foi excluída dos experimentos do perfil de reconhecimento antigênico e de avidéz.

A fim de caracterizar e analisar as possíveis variações do perfil antigênico entre cepas de *T. gondii*, STAg das cepas UDI-1, UDI-2, RH, ME49 e Santa Maria foram submetidos a gel de poliacrilamida e coradas com Coomassie. Um perfil semelhante entre as cepas de UDI-1, UDI-2, RH e ME49 pode ser observado (**Figura 5**). No entanto, o STAg da cepa de Santa Maria parece ter um padrão de proteína ligeiramente diferente, apresentando duas bandas distintas em relação às outras cepas. Foi observado uma fração proteica de aproximadamente 34 kDa fortemente marcada no extrato de Santa Maria e menos evidente nos outros STAg, como indicado na **figura 5**. Foi possível identificar também uma fração importante de proteínas marcada em torno de 53 kDa nos extratos de todas as cepas, exceto no de Santa Maria, cuja banda mostrou ser menos intensa.

O ensaio de IB é um método imunológico sensível que permite a identificação de proteínas antigênicas. Com exceção da amostra A28, todas as amostras foram positivas nos ensaios de IB para todas as cepas, representativamente demonstrado na **Figura 6**, corroborando com os resultados do ELISA (**Figura 4**). Estas são evidências de que é possível detectar IgG específica para diferentes frações de antígeno de *T. gondii* em amostras de LA.

Duas cepas clonais (RH e ME49), e três cepas atípicas (UDI-1; UDI-2 e Santa Maria) foram utilizadas para realizar o diagnóstico por IB nas amostras de LA, sendo possível observar diferenças no perfil de reconhecimento entre as cepas. Cada cepa apresentou seu próprio perfil de reconhecimento. Em geral, a linhagem RH apresentou seis frações antigênicas (P60, P50, P40, P37, P30 e P22 kDa) (**Figura 6A**); A cepa ME49 exibiu cinco frações (P40, P37, P34, P30 e P22 kDa) (**Figura 6B**); UDI-1 apresentou nove frações (P70, P60, P53, P40, P37, P34, P30, P22 e P10 kDa) (**Figura 6C**); UDI-2 apresentou perfil semelhante a ME-49 (**Figura 6D**) e a linhagem Santa Maria apresentou 4 frações (P60, P37, P30 e P22 kDa) (**Figura 6E**). Embora o perfil de reconhecimento varie entre as cepas, foram observadas três frações antigênicas em comum em pelo menos 50% das amostras (P37, P30 e P22).

Para avaliar a avidéz dos anticorpos IgG presente nas amostras de LA, selecionamos as cinco amostras listadas com baixo índice de avidéz de IgG em amostras de soro (**Tabela 1**). Os anticorpos do LA exibiram moderada a alta avidéz contra antígenos das cepas RH, ME49, UDI-1 e Santa Maria (**Figura 7**). Os resultados de avidéz de IgG de LA foram os seguintes: para as fitas com extrato de RH, todas as cinco amostras foram consideradas com moderada a alta avidéz, e seis frações reativas foram observadas (P80, P60, P40, P37, P30 e P22 kDa) e após a adição de uréia, a perda de reatividade foi apenas da fração P80 (**Figura 7A**). Para ME49, foram detectadas as seguintes frações reativas (P37, P34, P30 e P22 kDa) e após o tratamento com ureia a reatividade de P37 foi perdida em 50% das amostras (**Figura 7B**). Para cepa UDI-1 observou-se seis frações antigênicas reativas (P60, P40, P37, P34, P30 e P22 kDa), com perda das frações P60 e P40 após a adição de uréia (**Figura 7C**). Para UDI-2, foram observadas três frações reativas (P34, P30 e P22) que se mantiveram reativas após o tratamento com uréia em 3 das 5 amostras. Em duas amostras detectou-se a perda das frações P34 e P22, e indicaram baixa avidéz na análise de intensidade de bandas (**Figura 7D**). Por fim, o STAg de Santa Maria, foram identificadas seis frações antigênicas (P60, P37, P34, P30, P22 e P20 kDa) e apenas a banda de 60 kDa foi perdida após a adição de uréia (**Figura 7E**).

## 6. Discussão

A toxoplasmose é uma doença parasitária de ampla distribuição e estima-se que um terço da população esteja acometida (HAMPTON, 2015). A maioria dos casos é assintomática devido ao sucesso da resposta imune contra o parasito (HAMPTON, 2015). No entanto, casos graves podem levar a ocorrência de TC em gestantes, resultando em sérias complicações durante a formação fetal ou após o nascimento, principalmente durante a adolescência (WALLON et al, 2014). Nos Estados Unidos, estima-se que a ocorrência de TC esteja em torno de 500 a 5 mil casos por ano (HAMPTON, 2015). No Brasil, o número de casos é quatro vezes maior (NIEWIESK, 2014).

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* é realizado principalmente por meio de testes sorológicos, uma vez que os mecanismos de evasão do parasito por encistamento dificultam a detecção do mesmo em amostras biológicas. Em gestantes diagnosticadas sob alto risco de TC, recomenda-se a detecção do DNA do parasito em amostras de LA pelo método de PCR (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOY, 2004). Também é realizado o diagnóstico por ultrassom, onde é possível reconhecer alterações macroscópicas do feto como hidrocefalia, ventriculomegalia e calcificações intracerebrais (BISSATI et al., 2018). O teste molecular juntamente com o diagnóstico por imagem desempenham um papel crítico na decisão do tratamento. Em nosso estudo, todas as mulheres grávidas foram diagnosticadas com suspeita de primo infecção através dos testes sorológicos e, após quatro semanas do diagnóstico resultante do sorodiagnóstico, foi realizada a amniocentese para detectar o DNA de *T. gondii* em amostras de LA, procedimento padrão adotado no hospital. Apenas uma amostra foi positiva por PCR e a mãe teve seu tratamento modificado. Durante este estudo, nenhum caso de TC foi relatado nos prontuários até a data final do estudo.

É relatado que a imunidade materna é capaz de proteger o feto contra reinfecções, um dos mecanismos mais importantes seria a transferência dos anticorpos IgG anti-*T.gondii* maternos (JONES et al., 2009). Em humanos, a transferência de anticorpos é realizada através do receptor Fc (FcRn) encontrado na placenta (JONES et al., 2009). O sinciciotrofoblasto expressa receptores para Fc que reconhecem exclusivamente as moléculas de IgG através da identificação das cadeias pesadas do tipo gama, e realiza o transporte para o plasma fetal por diferença de pH. Consequentemente, estes receptores são incapazes de se ligarem a moléculas de IgM, IgA, IgE ou IgD (ROOPENIAN; AKILESH, 2007). As quatro subclasses de IgG podem atravessar essa barreira e dessa forma são detectadas no soro fetal e no LA (POMARES; MONTOYA, 2016). Apesar da capacidade de inativação e fixação de complemento demonstrada *in vitro* por IgG anti-*T. gondii*, as informações sobre a importância exata dos

anticorpos na proteção congênita ainda não são bem compreendidas (HAUMONT; DELHAYE; GARCIA, 2000). Alguns estudos sugerem um papel protetivo dos anticorpos (MINEO et al., 1993; LETSCHER-BRU et al., 2003). Por outro lado, já é aceito que a resposta celular Th1 e a produção de IFN- $\gamma$  representam uma forma eficaz na defesa contra o parasito. As citocinas, além de serem também sintetizadas pela placenta, são capazes de atravessar a barreira placentária (HEIKKINEN et al., 2001). No presente estudo, obtivemos sucesso em detectar IgG anti-*T. gondii* no LA de todas as pacientes, indicando que este isotipo de anticorpo está presente no LA, assim como foi relatado por Quan e colaboradores (1999). Além disso, essa transferência de anticorpos mãe-feto pode ser importante para determinar o perfil da resposta imune materna produzida contra antígenos de *T. gondii* e, conseqüentemente, para proteger o feto.

Embora seja reconhecido que a TC ocorre quando há a passagem de taquizoítos pela barreira placentária em gestantes durante a fase aguda da primoinfecção, levando a sérios comprometimentos fetais, alguns estudos questionam este dogma (MONTROYA, 2018; BERTRANPETIT et al., 2017). Já foi relatado que a TC pode ocorrer em mãe imunocompetente com infecção crônica por reativação da infecção (DOS SANTOS et al., 2016). Durante a gravidez, os períodos de imunossupressão natural, com a finalidade de proteger o feto de uma rejeição imune, podem favorecer a reagudização da doença permitindo a liberação de parasitos antes contidos em cistos. Além disto, cistos viáveis no endométrio podem estar sujeitos ao rompimento por distensão mecânica ou ação lítica das vilosidades coriônicas. Os bradizoítos, uma vez livres dos cistos, podem alcançar os tecidos fetais (KAWAZOE, 2005). Andrade e colaboradores (2010) publicaram um relato de caso onde uma gestante, cronicamente infectada há 10 anos, deu à luz a um RN com títulos detectáveis de IgM ao nascer e múltiplas lesões retinocoroideanas ativas na periferia da retina dos dois olhos após completar 1 ano de idade. Apesar de não apresentar nem sorologia compatível com a fase aguda da infecção ou qualquer sinal de imunodeficiência, a gestante teve reativação da infecção crônica detectada através de uma retinocoroidite no olho esquerdo, nas últimas semanas de gestação.

Além dos casos de infecção congênita “atípica” por reativação de uma infecção crônica, também é questionado a possibilidade da ocorrência de TC por reinfeção com cepas diferentes. Há trabalhos que mostram a ineficiência da resposta adquirida de uma primeira infecção na proteção contra uma reinfeção em modelo animal, principalmente se tratando de cepas com genótipos muito distintos. Araujo e colaboradores (1997) demonstraram que camundongos Swiss primo infectados por 60 dias com a cepa tipo II ME49 apresentavam sinais claros de

toxoplasmose aguda, após 15 dias de infecção com cistos teciduais de uma cepa recombinante tipo II R-C57, variante da cepa C57, os animais apresentaram taquizoítos na cavidade peritoneal e pulmões, vindo a óbito. Outro trabalho publicado por Dao e colaboradores (2000) demonstrou que camundongos OF1 aumentavam a quantidade de cistos teciduais quando reinfectedos com cepas de genótipo diferente, porém mantinham o mesmo padrão quando reinfectedos com uma cepa do mesmo tipo genótipo.

Brandão e colaboradores (2009), infectaram BALB/c com a cepa atípica brasileira não virulenta D8 e, após 45 ou 180 dias, foram reinfectedos com duas cepas recombinantes virulentas, EGS e CH3. Os resultados mostraram que após 45 dias houve uma reinfecção apenas pela cepa EGS e após 180 dias foi detectado a infecção por EGS e CH3 através de análises de PCR-RFLP. Além disto, houve um aumento nos níveis de IL-10, IgG1 e IgA no intervalo de 180 dias entre a primeira infecção e as reinfecções nos animais. Os pesquisadores concluíram que a diferença de genótipos pode ser um fator determinante, entretanto, o tempo em que ocorrerá a nova infecção e a resposta imune do hospedeiro também podem influenciar o curso da doença.

Trabalhos prévios do nosso grupo de estudo isolaram duas cepas atípicas de coração de galinhas na região de Uberlândia (MG). Por genotipagem, as cepas foram caracterizadas como virulentas e denominadas UDI-1 e UDI-2 (LOPES et al., 2016). Também foi demonstrado que animais *Calomys callosus* gestantes cronicamente infectados com cistos da cepa clonal ME49 perdem a proteção contra *T. gondii* quando reinfectedos com essas cepas atípicas (FRANCO et al., 2015). Os parasitos foram detectados na prole apenas do grupo reinfectedos. Além disso, os animais reinfectedos com a cepa UDI-2 demonstram uma maior perda de prole, maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias e produção de IgG2a, corroborando com a ideia de Brandão e colaboradores (2009) que sugeriu que existem diferenças clínicas entre cepas atípicas após uma reinfecção. Sabe-se que os isolados brasileiros de *T. gondii* são caracterizados como recombinantes (BERTRANPETIT et al., 2017), assim se associarmos esse fato com as diferenças no perfil de reconhecimento dos anticorpos presentes nas amostras de LA contra STAg de diferentes cepas encontrados neste estudo, podemos sugerir que a existência de cepas atípicas pode estar associada a falha na proteção materno-fetal, explicando o alto número de casos de TC relatado no Brasil (DUBEY et al., 2012).

Além de estudos com modelos animais, Elbez-rubinstein e colaboradores publicaram um relato de caso em 2009 de um caso de toxoplasmose congênita em um RN de uma mãe reinfecteda após ingerir carne de cavalo malcozida. Este relato de caso ocorreu na França e a paciente apresentava uma sorologia compatível com uma infecção crônica relatada em uma

primeira gravidez, IgG positiva e IgM negativa, no início da segunda gravidez. Apesar disto, já com 32 semanas de gravidez, os testes sorológicos detectaram um aumento nos níveis de IgG e, após o nascimento da criança, a presença de IgM específica no soro. Após o nascimento, o diagnóstico de TC foi dado por um oftalmologista pela presença de múltiplos focos de coriorretinite em ambos os olhos da criança além de uma inflamação moderada na macula do olho direito. Os pesquisadores conseguiram o isolamento do parasito por bioensaio do sangue periférico do RN. A cepa possuía uma alta virulência nos camundongos infectados que morriam com 9 dias de infecção. Além disto, a genotipagem da cepa mostrou marcadores que não permitiam sua classificação em nenhum dos três tipos clonais existentes. Os pesquisadores ainda executaram um modelo de reinfecção utilizando a cepa PRU e o isolado, confirmando que de fato a imunidade adquirida de uma infecção por uma cepa tipo da Europa parece não ser capaz de proteger contra a cepa recombinante encontrada no sangue do RN.

De fato, cepas distintas apresentam diferenças em suas proteínas efetoras que estimulam vias imunes distintas (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2012). Em nosso estudo, observamos algumas dessas diferenças nos extratos proteicos fracionados obtidos de cada cepa utilizada (RH, ME49, UDI-1, UDI-2 e Santa Maria), após a separação por eletroforese. Uma das proteínas relatadas, por ter sido fortemente marcada em todos os extratos em comparação com o extrato de Santa Maria, foi a fração P53. Uma das principais proteínas encontradas nesta banda é a roptria 16 (ROP16), descrita como uma das proteínas envolvidas no processo de invasão celular e capaz de invadir o núcleo da célula hospedeira (Chang et al., 2015). Já a fração P34 foi mais fortemente expressa no extrato de Santa Maria. Park e Nam (1999) sugerem que a fração de proteínas P34 seria composta principalmente pela proteína roptria 9 (ROP9). A ROP9 é uma roptria solúvel expressa apenas em taquizoítos e pode estar envolvida nos estágios iniciais da invasão (Chen et al., 2014). Uma das hipóteses levantadas seria a relação destas proteínas com os mecanismos de invasão de cada cepa no hospedeiro, o que possivelmente teria uma influência direta no perfil da resposta imune. Embora existam diferenças nos perfis proteicos dos extratos avaliados neste estudo, não foi possível encontrar a real relação entre a maior ou menor expressão destas proteínas na biologia das cepas envolvidas, sendo necessário estudos mais específicos sobre a composição proteica de cada uma das cepas. É importante ressaltar que independente da cepa utilizada, foi observado que a reatividade com os anticorpos presentes em amostras de LA foi diferente entre os STAgS, indicando uma diferença perceptível nas proteínas antigênicas dominantes em cada uma das cepas.

Entre todas as cepas apenas três frações proteicas foram reconhecidas por pelo menos 50% dos anticorpos presentes nas amostras de LA: P37, P30 e P22. A fração P30 tem como principal representante o antígeno solúvel de *T. gondii* 1 (SAG 1), uma proteína de superfície bem caracterizada além de muito expressa e conservada na maioria das cepas de toxoplasma. SAG 1 é extremamente imunogênica estimulando a produção de altos títulos de anticorpos nos indivíduos infectados (NAGEL; BOOTHROYD, 1989). Tem como função primordial a ligação nas proteínas de superfície da célula hospedeira durante o processo de invasão de *T. gondii*. A fração P22 representa principalmente SAG 2, outra proteína muito expressa pelo parasito. As proteínas da família SAG 2 também participam ativamente da ligação e invasão às células hospedeiras (LAI; LAU, 2017). Costa e col. (2017) corroborando com os dados de Parmley e col. (1992) sugerem esta proteína como um potencial marcador sorológico de infecção. A proteína de grânulo denso 24 (GRA24) pode ser encontrada nas proximidades da fração de 37 kDa. Esta proteína é liberada pelo parasito afim de promover a interação parasito-célula hospedeira, incluindo alterações na resposta imune gerada (BRAUN et al., 2013). Por ser uma análise especulativa, não foi possível descrever especificamente quais as proteínas encontradas na fração P37. Entretanto, podemos dizer que as proteínas SAG 1 e SAG 2, já bem descritas nas frações P30 e P22, foram encontradas em todos os extratos, e estas são essenciais para o ciclo e desenvolvimento de *T. gondii* em geral. Quanto às diferenças encontradas no reconhecimento, nossos resultados demonstraram a existência de padrões distintos de reconhecimento entre eles. Ficou evidente que o isolado UDI-1, uma linhagem atípica de nossa região, apresentou bandas antigênicas mais reativas do que as outras. UDI-1 obteve nove frações reativas em pelo menos 50% das amostras de LA. Em contraste, a UDI-2, outro isolado regional, que exibiu apenas cinco frações reativas na maioria das amostras de LA, sendo similar a ME49 no perfil de reconhecimento. Já na análise de um isolado atípico proveniente do sul do Brasil, denominado Santa Maria devido a cidade de origem, foi encontrado um menor número de proteínas reativas, apenas quatro, em relação às demais cepas.

Sabe-se que cepas atípicas podem reinfectar mães soropositivas para *T. gondii* e induzir TC em modelo animal, e nossos resultados sugerem que essa perda de proteção pode estar relacionada aos anticorpos, que apresentaram diferenças na reatividade contra diferentes cepas, mais específicos contra antígenos de uma cepa do que outras. Embora não seja bem esclarecido o papel e a real importância na TC, acredita-se que os anticorpos IgG maternos são capazes de conferir proteção pela capacidade de alcançarem a circulação do feto e conseqüentemente reduzir a parasitemia placentária e fetal (Correa, 2007). Desta forma, se não houver o

reconhecimento eficaz desses anticorpos com diferentes cepas de *T. gondii*, isso pode resultar em falha de proteção. Entre os diferentes isolados testados, observamos um perfil distinto de reatividade usando preparações STAg de diferentes cepas de *T. gondii* contra a mesma amostra de LA. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a real diferença entre as proteínas mais imunogênicas e a resposta imune gerada contra as diferentes cepas, além de como isso pode influenciar a patogênese da toxoplasmose durante a gestação.

Xiao e Yolken (2015) sugerem que o desenvolvimento clínico da toxoplasmose está intimamente relacionado à cepa do parasito, e recomendam que a identificação da cepa pode melhorar a abordagem do tratamento e sua eficácia. A identificação da cepa durante uma primo infecção materna, pode auxiliar no tratamento, entretanto, não é um indicativo de proteção durante uma reinfecção. Curiosamente, nos prontuários, 5 das pacientes foram diagnosticados com IgG de baixa avidéz, enquanto apenas duas amostras de LA foram caracterizadas com baixa avidéz contra os antígenos de UDI-2. Reforçando a ideia de que a preparação STAg de diferentes cepas confere perfis distintos de reatividade. Nós hipotetizamos que os resultados de avidéz nas amostras de LA foram diferentes do soro não apenas pelo tipo de cepa utilizada nos ensaios, mas também pela diferença de tempo entre a realização dos exames hospitalares e as coletas de amostras. As amostras de LA foram coletadas quatro semanas após confirmação da soropositividade dos pacientes. Ainda assim, diferente do esperado, duas amostras permaneceram com baixa avidéz de IgG contra a cepa UDI-2.

Interessantemente, apesar da grande semelhança entre as cepas UDI-2 e ME49 na análise de extratos e de reconhecimento antigênico, ambas apresentaram um comportamento distinto em relação a patogenia no estudo de FRANCO et al., (2015); no qual foi demonstrado que a reinfecção pela cepa UDI2 de animais cronicamente infectados com ME49 promoveu o desenvolvimento de toxoplasmose congênita. Em nosso estudo foi possível detectar que embora existam semelhanças no perfil proteico de UDI2 e ME49, a força de avidéz de IgG nas amostras de LA foi diferente, sendo 2 amostras com baixa avidéz para o STAg de UDI2. Este resultado levanta a postulação de que diferenças sutis na composição proteica podem ter um grande impacto na patogenia e regulação da resposta imune do hospedeiro. Estes dados nos alertam sobre a importância do diagnóstico por cepa e a revisão dos protocolos de tratamento. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer como diferentes linhagens diferem no reconhecimento imunológico e nas respostas imunes durante a patogênese da toxoplasmose.

## 7. Conclusão

Em conjunto, com base em nossos resultados podemos concluir:

- Das 33 pacientes suspeitas de TC, 32 apresentaram positividade no diagnóstico por ELISA em amostras de LA;
- A confirmação da presença de anticorpos no LA, reforçando a hipótese de sua importância na defesa contra infecções congênitas;
- Diferentes cepas de *T. gondii* expressam diferentes proteínas em sua superfície, o que pode ter um impacto importante na resposta imune e patogenicidade da infecção.
- De 5 pacientes diagnosticadas com IgG de baixa avididade apenas 2 obtiveram o mesmo resultado em ensaio de IB realizado com amostras de LA. Interessantemente, essa baixa avididade foi observada apenas contra o STAg da cepa UDI-2;
- Os anticorpos presentes no LA de mães de alto risco reconhecem distintamente STAg de diferentes cepas, o que pode ser a causa da falha na proteção durante a reinfecção por outra cepa, mesmo se esta cepa fosse da mesma região.

## 8. Tabelas

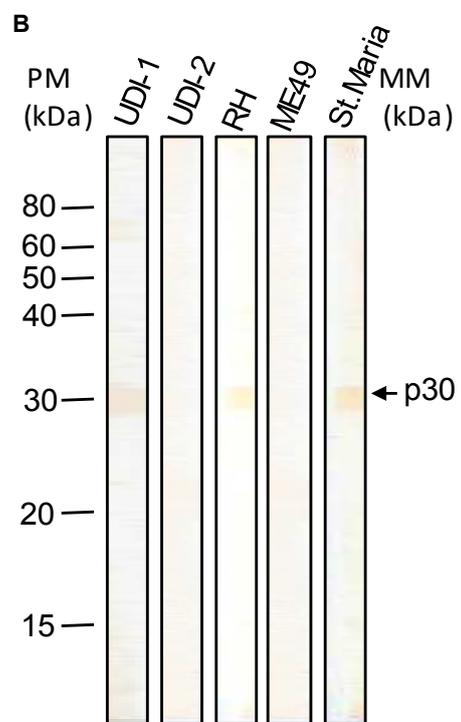
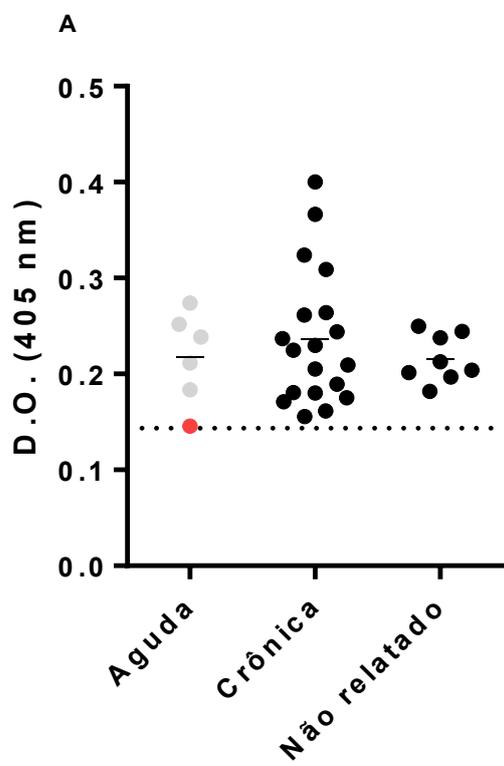
**Tabela 1.** Informações dos prontuários das pacientes doadoras de LA soropositivas para a infecção por *T. gondii*

Amostra	Sorologia			Tratamento	PCR
	IgM	IgG	Avidez		
A1	+	+	Fraca	Espiramicina/PSA	+
A2	+	+	Forte	Espiramicina	-
A3	N.R.	N.R.	N.R.	Espiramicina	-
A4	+	+	Forte	Espiramicina	-
A5	-	+	Forte	Espiramicina	-
A6	N.R.	N.R.	N.R.	Espiramicina	-
A7	Ind.	+	Forte	Espiramicina	-
A8	N.R.	N.R.	N.R.	Espiramicina	-
A9	+	+	Fraca	Espiramicina	-
A10	+	+	Forte	Espiramicina	-
A11	+	+	N.R.	Espiramicina	-
A12	-	+	Forte	Espiramicina	-
A13	+	+	Forte	Espiramicina	-
A14	+	+	Fraca	Espiramicina	-
A15	+	+	Forte	Espiramicina	-
A16	+	+	Moderada	Espiramicina	-
A17	+	+	Fraca	Espiramicina	-
A18	+	+	Forte	Espiramicina	-
A19	Ind.	+	N.R.	Espiramicina	-
A20	+	+	Forte	Espiramicina	-
A21	+	+	Moderada	Espiramicina	-
A22	+	+	N.R.	Espiramicina	-
A23	+	+	Fraca	Espiramicina	-
A24	+	+	Moderada	Espiramicina	-
A25	+	+	N.R.	Espiramicina	-
A26	+	+	Forte	Espiramicina	-
A27	+	+	Moderada	Espiramicina	-
A28	+	-		Espiramicina	-
A29	+	+	Forte	Espiramicina	-
A30	+	+	Forte	Espiramicina	-
A31	+	+	Moderada	Espiramicina	-
A32	+	+	Moderada	Espiramicina	-
A33	+	+	Forte	Espiramicina	-

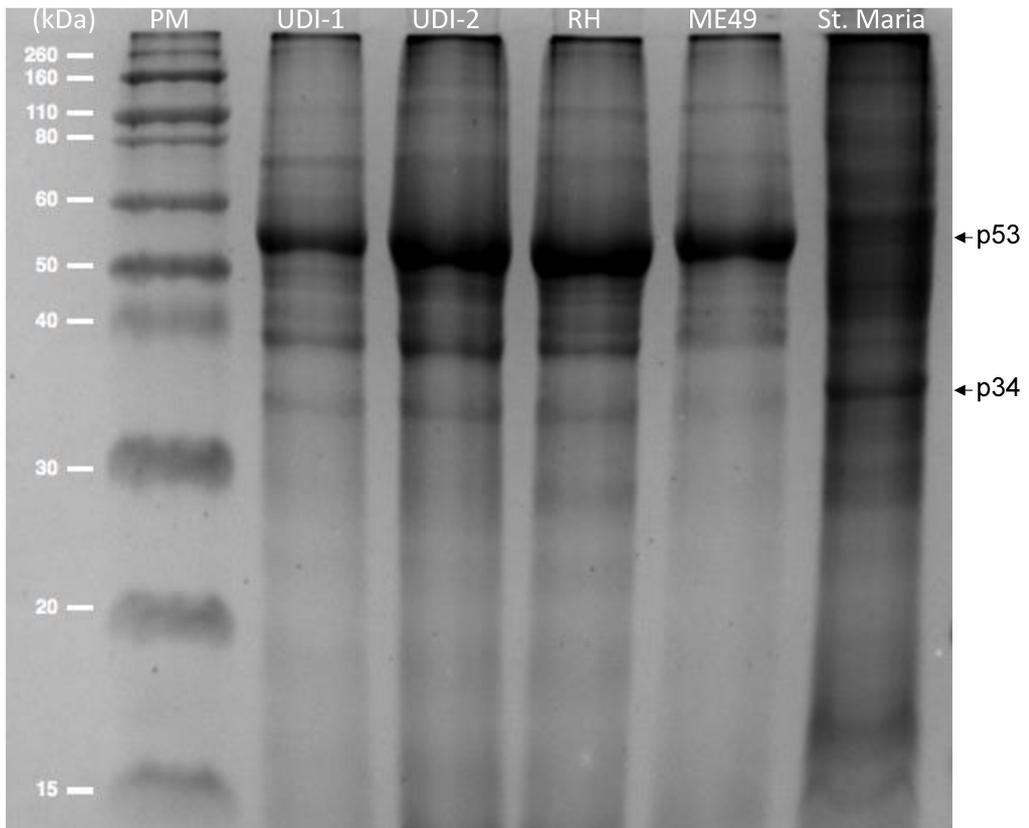
N.R.: Não Relatado; Ind.: Indeterminado; PSA: Pirimetamina e sulfadiazina; - amostra negativa; + amostra positiva



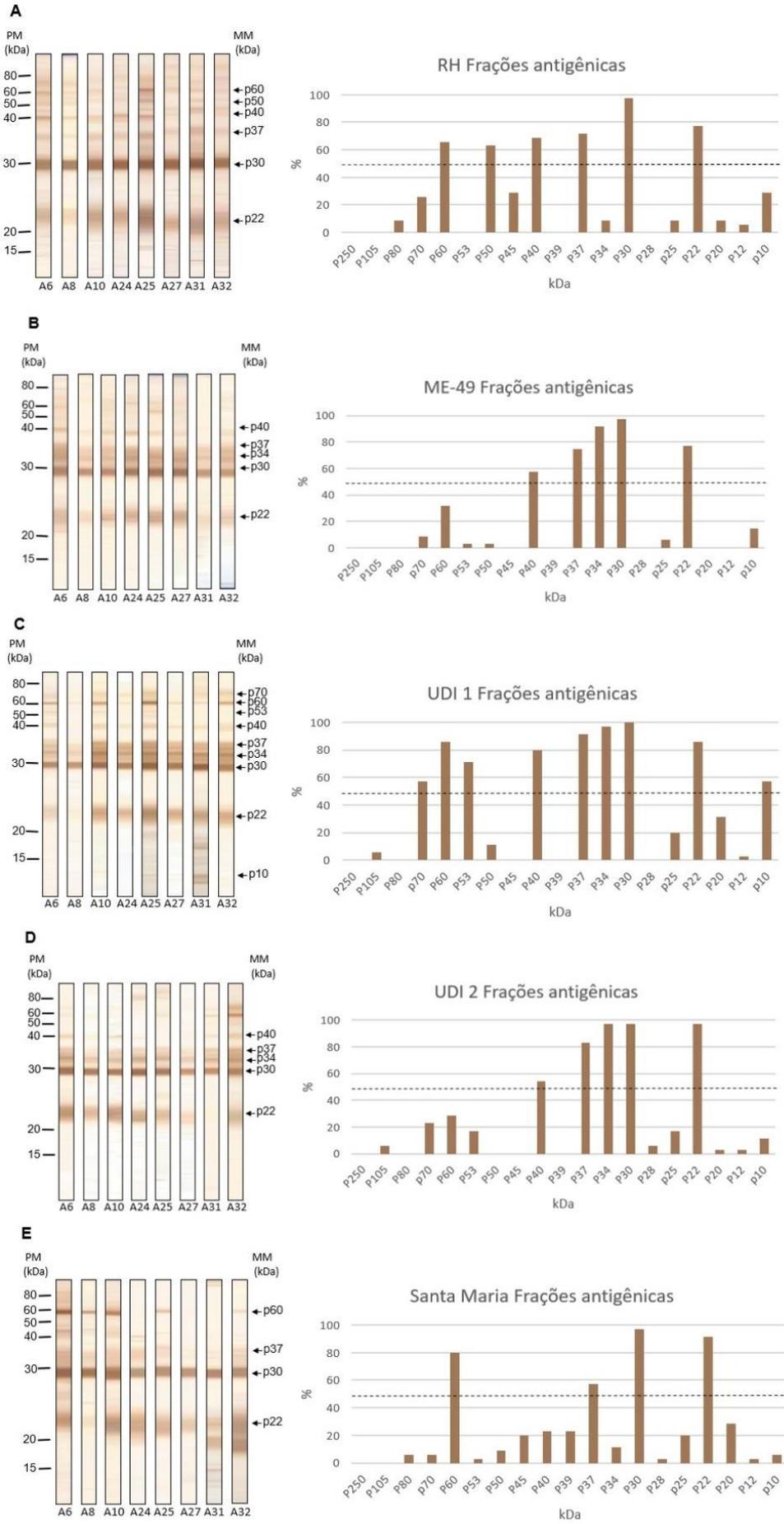
## 9. Figuras



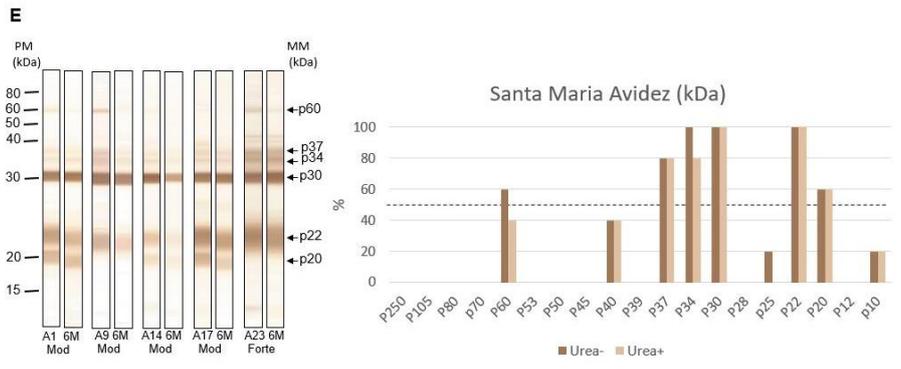
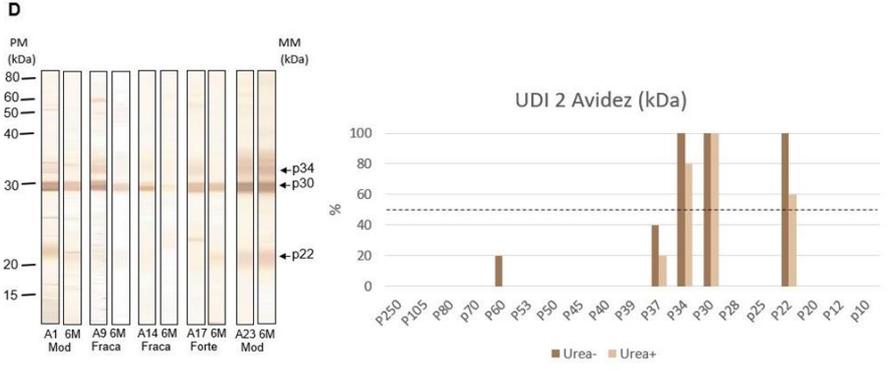
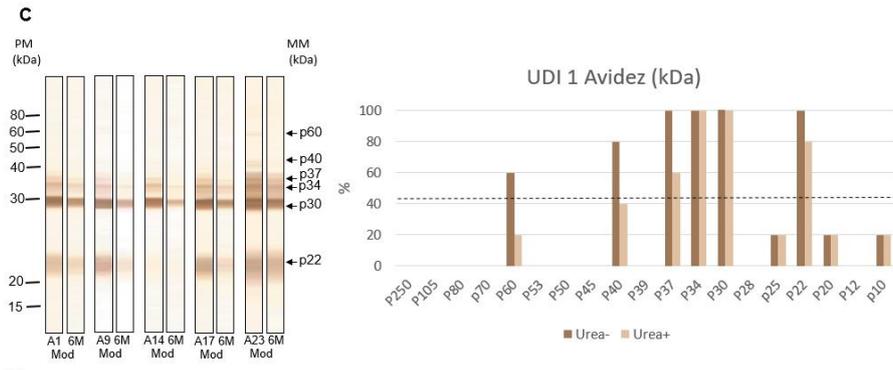
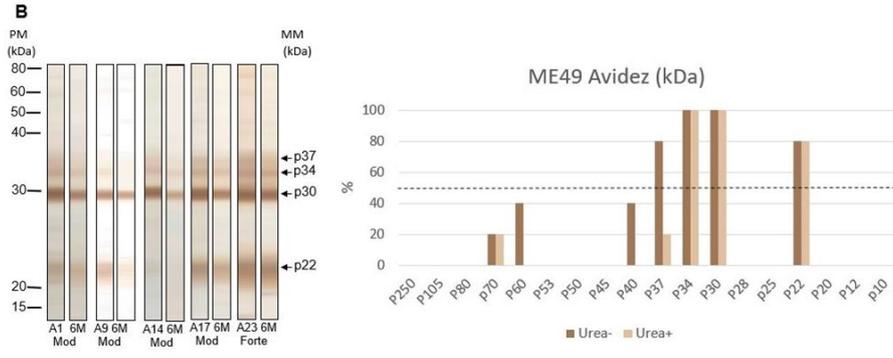
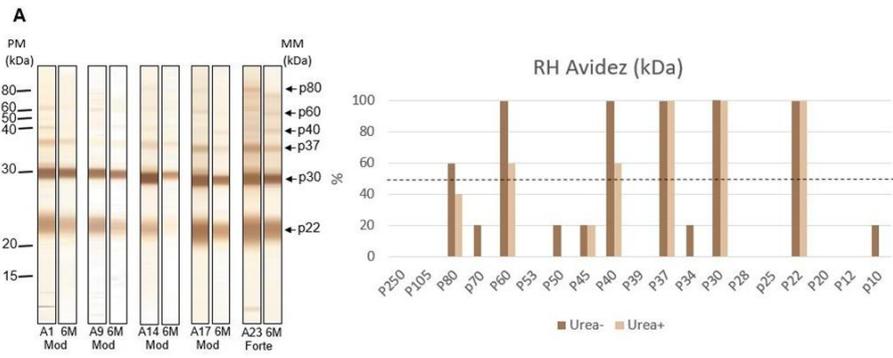
**Figura 4.** (A) Análise do nível de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de LA de gestantes em fase aguda e crônica da infecção, segundo as informações sorológicas encontradas nos prontuários. Também foi demonstrado os resultados das amostras sem informações sobre avides. O ponto vermelho representa a amostra A28. (B) Perfil de bandas antigênicas da amostra A28 contra UDI-1, UDI-2, RH, ME49 e Santa Maria obtidos por *Immunoblotting*. Padrão de peso molecular (PM) e massa molecular aparente (MM) expressos em KiloDaltons (kDa) representados respectivamente a esquerda e a direita.



**Figura 6.** Perfil proteico de antígenos solúveis de *T. gondii* das cepas UDI-1, UDI-2, RH, ME49 e Santa Maria em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) corado com coomassie azul. Peso molecular (PM) expresso em KiloDalton (kDa) (Padrões de Proteína *Novex® Sharp Pre-Stained*).



**Figura 7.** Perfil de bandas antigênicas de STAg representativo e gráfico de frequência (%) de reconhecimento por anticorpos anti-*T gondii* de amostras de LA contra (A) RH; (B) ME49; (C) UDI-1; (D) UDI-2; e (E) Santa Maria obtidos por *Immunoblotting*. A linha pontilhada indica a frequência de frações antigênicas em pelo menos 50% das amostras. Padrão de peso molecular (PM) e massa molecular aparente (MM) expressos em KiloDaltons (kDa) representados respectivamente a esquerda e a direita.



**Figura 8.** Perfil de bandas antigênicas reconhecidas em teste de avidéz e índices de avidéz de IgG contra (A) RH; (B) ME49; (C) UDI-1; (D) UDI-2; e (E) Santa Maria obtidos por *Immunoblotting*. A linha pontilhada indica a frequência de frações antigênicas em pelo menos 50% das amostras. Padrão de peso molecular (PM) e massa molecular aparente (MM) expressos em KiloDaltons (kDa) representados respectivamente a esquerda e a direita.

## 10. Referências

AFONSO, E.; THULLIEZ, P.; GILOT-FROMONT, E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). **International Journal of Parasitology**, v. 36, n. 13, p. 1373-82, 2006  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.07.010>

AHMADPOUR, E.; DARYANI, A.; SHARIF, M.; SARVI, S.; AARABI, M.; MIZANI, A.; RAHIMI, M. T.; SHOKRI, A. Toxoplasmosis in immunocompromised patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 12, p. 1503-1510, 2014.  
<https://doi.org/10.3855/jidc.4796>

AJZENBERG, D.; COGNE, N.; PARIS, L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. **Journal Infectious Diseases**, v.186, n. 5, p. 684-689, 2002.  
<https://doi.org/10.1086/342663>

ANDRADE, G. M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; CARELLOS, E. V.; ROMANELLI, R. M.; VITOR, R. W.; CARNEIRO, A. C.; JANUARIO, J. N. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. **Jornal de Pediatria (Rio J)**, v. 86, n. 1, p. 85-8, 2010.  
DOI: 10.2223/JPED.1948

ANGELONI, M.B.; GUIRELLI, P.M.; FRANCO, P.S.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; CASTRO, A.S.; SILVA, N.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, T.W.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta**, v. 34, n. 11, p. 973-982, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.09.005>

ARAUJO, F.; SLIFER, T.; KIM, S. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 3, p. 521-2, 1997.  
<https://doi.org/10.2307/3284421>

ASSOLINI, J. P.; CONCATO, V. M.; GONCALVES, M. D.; CARLOTO, A. C. M.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R.; MELANDA, F. N.; COSTA, I. N. Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications. **Parasitology Research**, v. 116, n. 6, p. 1603-1615, 2017.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-017-5458-2>

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426-430, 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00205-1)

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; BUCALA, R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. **Journal Molecular Medicine**, v. 76, n. 4, p.151-161, 1998.  
<https://doi.org/10.1007/s001090050204>

BERRETT, A. N.; GALE, S. D.; ERICKSON, L. D.; BROWN, B. L.; HEDGES, D. W. *Toxoplasma gondii* Moderates the Association between Multiple Folate-Cycle Factors and Cognitive Function in U.S. Adults. **Nutrients**, v. 9, n. 6, 2017.  
<https://doi.org/10.3390/nu9060564>

BERTRANPETIT, E.; JOMBART, T.; PARADIS, E.; PENA, H.; DUBEY, J.; SU, C.; MERCIER, A.; DEVILLARD, S.; AJZENBERG, D. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 150-155, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.020>

BISSATI K.; LEVIGNE, P.; LYKINS, J. Global initiative for congenital toxoplasmosis: an observational and international comparative clinical analysis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 165, 2018.  
<https://doi.org/10.1038/s41426-018-0164-4>

BLADER, I. J.; COLEMAN, B. I.; CHEN, C. T.; GUBBELS, M. J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 463-85, 2015.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BLANCO-LAGO, R.; GARCÍA-PEÑAS, J. J.; CONEJO - MORENO, D.; CANTARÍNEXTEMA, V.; LEÓN, M.; DUAT-RODRIGUEZ, A. Congenital toxoplasmosis and cortical development malformation: na infrequent association. **Revista de Neurología**, v. 50, n. 4, p. 16-28, 2010.  
<https://doi.org/10.33588/rn.5004.2009754>

BOJAR, I.; SZYMAŃSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*--state of the art. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 17, n. 2, p. 209-14, 2010.

BOSCH-DRIESEN, E.H.; ROTHOVA, A. Recurrent ocular disease in postnatally acquired toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**, v.128: p.421-425, 1999.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(99\)00271-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(99)00271-8)

BOYER, K. M.; REMINGTON, J. S.; MACLEOD, R. L. Toxoplasmosis. In: Feigin and Cherry, ed. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. **Philadelphia: WB Saunders Company**, p. 2473-2490, 1998.

BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N.; GAZZINELLI, R. T.; CAETANO, B. C.; FERREIRA, A. M.; SILVA, L. A.; VITOR, R. W. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN-gamma and IL-10. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 241-5, 2009.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200017>

BRAUN, L.; BRENIER-PINCHART, M. P.; YOGAVEL, M.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R. L.; HUSSAIN, T.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; TARDIEUX, I.; SHARMA, A.; BELRHALI, H.; BOUGDOUR, A.; HAKIMI, M.A. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 4, p. 2071-2086, 2013.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20130103>

BUCHBINDER, S.; BLATZ, R.; RODLOFF, A. C. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 4, p. 269-71, 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00549-7](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00549-7)

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; SPIEGEL, L. A.; BACHER, M.; DONNELLY, T.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF as glucocorticoid-induced counter-regulator of cytokine production. **Nature**, v. 377, n. 6544, p. 68-71, 1995.  
<https://doi.org/10.1038/377068a0>

CARDOSO, M. R. D., MOTA, C. M., RIBEIRO, D. P., SANTIAGO, F. M., CARVALHO, J. V., ARAUJO, E. C. B., SILVA, N. M., MINEO, T. W. P., ROQUE-BARREIRA, M. C., MINEO, J. R., SILVA, D. A. O. ArtinM, a d-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. **Vaccine**, v. 29, p. 9183- 9193, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.136>

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: A review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.018>

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 421-8, 1999  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01174.x>

CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. O.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 8, p. 1265-1271, 2008.  
<https://doi.org/10.1128/CVI.00069-08>

CASTRO-FILICE, L. S; BARBOSA, B. F; ANGELONI, M. B; SILVA, N. M; GOMES, A. O; ALVES, C. M; SILVA, D. A; MARTINS-FILHO, O. A; SANTOS, M. C; MINEO, J. R; FERRO, E. A. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, p. 12:132, 2014.  
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-132>

CHAICHAN, P.; MERCIER, A.; GALAL, L.; MAHITTIKORN, A.; ARIEY, F.; MORAND, S.; BOUMEDIENE, F.; UDONSOM, R.; HAMIDOVIC, A.; MURAT, J. B.; SUKTHANA, Y.; DARDE, M. L. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 227-238, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.002>

CHANG, S.; SHAN, X.; LI, X.; FAN, W.; ZHANG, S. Q.; ZHANG, J.; JIANG, N.; MA, D.; MAO, Z. *Toxoplasma gondii* Rhopty Protein ROP16 Mediates Partially SH-SY5Y Cells

Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Directing Ser15/37 Phosphorylation of p53. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 10, p. 1215-25, 2015.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.10516>

CHEN, J.; ZHOU, D. H.; LI, Z. Y.; PETERSEN, E.; HUANG, S. Y.; SONG, H. Q.; ZHU, X. Q. *Toxoplasma gondii*: protective immunity induced by rhoptry protein 9 (TgROP9) against acute toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 139, p. 42-8, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.016>

CHEN, S. J.; ZHANG, Y. X.; HUANG, S. G.; LU, F. L. Galectins expressed differently in genetically susceptible C57BL/6 and resistant BALB/c mice during acute ocular *Toxoplasma gondii* infection. **Parasitology**, v. 144, n. 8, p. 1064-1072, 2017.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182017000270>

CHING, X. T.; FONG, M. Y.; LAU, Y. L. evaluation of immunoprotection conferred by the subunit vaccines of GRA2 and GRA5 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 609, 2016.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00609>

COMMODARO, A. G.; BELFORT, R. N.; RIZZO, L. V.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; BURNIE JR, M. N.; BELFORT JR, R. Ocular toxoplasmosis-an update and review of the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 345-350, 2009.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200030>

CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 651-60, 2007.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00982.x>

COSTA, J. G.; PERETTI, L. E.; GARCÍA, V. S.; PEVERENGO, L.; GONZÁLEZ, V. D. G.; GUGLIOTTA, L. 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, 2017.  
<https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0331>

DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and Toxoplasma: Implications for public health. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 34-52, 2010.  
<https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01273.x>

DAO, A.; FORTIER, B.; SOETE, M.; PLENAT, F.; DUBREMETZ, J. F. Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 1, p. 63-5, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00151-X)

DARDÉ, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita**, v. 40, n. 1, p. 57-63, 2004.

DE OLIVEIRA-AZEVEDO, C. T.; DO BRASIL, P. E.; GUIDA, L.; 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.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149938>

DE PASCHALE, M.; AGRAPPI, C.; BELVISI, L.; CAGNIN, D.; CERULLI, T.; CLERICI, P.; MIRRI, P.; MANCO, M. T.; CAVALLARI, S.; VIGANÒ, E. F. Revision of the positive predictive value of IgM anti-Toxoplasma antibodies as an index of recent infection. **The New Microbiologica**, v. 31, n. 1, p. 105-111, 2008.

DE-LA-TORRE, A.; PFAFF, A. W.; GRIGG, M. E.; VILLARD, O.; CANDOLFI, E.; GOMEZ-MARIN, J. E. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. **Cytokine**, v. 68, n. 1, p. 23-31, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.03.005>

DOBREVA, M. P.; PEREIRA, P. N. G.; DEPREST, J.; ZWIJSEN, A. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 5, p. 761-777, 2010.  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.092935md>

DOLIWA, C.; XIA, D.; ESCOTTE-BINET, S.; NEWSHAM, E. L.; SANDERSON, S. J.; AUBERT, D.; RANDLE, N.; WASTLING, J. M.; VILLENA, I. Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of *Toxoplasma gondii* using difference-gel electrophoresis (DIGE). **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 3, p. 35-44, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.12.002>

DOS SANTOS, T. R.; FARIA, G. D.; GUERREIRO, B. M.; DAL PIETRO, N. H.; LOPES, W. D.; DA SILVA, H. M.; GARCIA, J. L.; LUVIZOTTO, M. C.; BRESCIANI, K. D.; DA COSTA, A. J. Congenital Toxoplasmosis in Chronically Infected and Subsequently Challenged Ewes. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0165124, 2016.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165124>

DRUCKMANN, R.; DRUCKMANN, M. A. Progesterone and the immunology of pregnancy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 97, n. 5, p. 389-96, 2005.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.08.010>

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. 267-99, 1998.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

DUBEY, J. P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O. C. H.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1559-1565, 2007b.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182007003083>

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-82, 2009

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M. F.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **The Journal of parasitology**, v. 96, n. 4, p. 709-712, 2010.  
<https://doi.org/10.1645/GE-2425.1>

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, 2012.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

DUBEY, J. P.; FERREIRA, L. R.; ALSAAD, M.; VERMA, S. K.; ALVES, D. A.; HOLLAND, G. N.; MCCONKEY, G. A. Experimental toxoplasmosis in rats induced orally with eleven strains of *Toxoplasma gondii* of seven genotypes: tissue tropism, tissue cyst size, neural lesions, tissue cyst rupture without reactivation, and ocular lesions. **PLoS One**, v. 11, n. 5, 2016.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156255>

EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology & Cell Biology**, v. 90, n. 7, p. 668-675, 2012.  
<https://doi.org/10.1038/icb.2011.93>

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. 280-5, 2009.  
<https://doi.org/10.1086/595793>

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190-196, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**, v. 122, n. 4, p. 335-353, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.puhe.2007.08.009>

FABIANI, S.; PINTO, B.; BONUCCELLI, U.; BRUSCHI, F. Neurobiological studies on the relationship between toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 351, n. 1-2, p. 3-8, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.02.028>

FALLAH, I. S.; ROSTAMI, A.; NOUROLLAHPOUR, S. M.; BEHNIAFAR, H.; PAKTINAT, S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 47, n. 3, p. 133-140, 2018  
<https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2017.12.003>

FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; DE ALMEIDA-NETO, J. L.; DE MELO, L. R. B.; DE MORAIS, D. F.; ALVES, B. F.; NAKASHIMA, F.; GENNARI, S. M.; ATHAYDE, A. C. R.; DE JESUS PENA, H. F. First report of typical Brazilian *Toxoplasma gondii* genotypes from isolates of free-range chickens (*Gallus gallus domesticus*) circulating in the state of Paraíba, Northeast Brazil. **Parasitology Research**, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s00436-017-5531-x>

FENOY, I. M.; BOGADO, S. S.; CONTRERAS, S. M.; GOTTIFREDI, V.; ANGEL, S. O. The knowns unknowns: exploring the homologous recombination repair pathway in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 627, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00627>

FERREIRA, I. M.; VIDAL, J. E.; COSTA-SILVA, T. A.; MEIRA, C. S.; HIRAMOTO, R. M.; PENALVA DE OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v.118, n. 2, p. 221-227, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.08.006>

FERREIRA, I. M.; BRANDÃO DE MATTOS, C. C.; FERREIRA, A. I. C.; FREDERICO, F. B.; ALMEIDA JR, G. C.; MATTOS, L. C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* provenientes de pacientes com toxoplasmose ocular residentes em São José do Rio Preto, São Paulo, BR. **Revista Saúde**, v. 4, n. 1, 2010.

FERRO, E. A.; MINEO, J. R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D. A.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L. R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **American Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 50-58, 2008.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070432>

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, p. 71-80, 2004.

FINDAL, G.; STRAY-PEDERSEN, B.; HOLTER, E. K.; BERGE, T.; JENUM, P. A. Persistent Low *Toxoplasma* IgG Avidity Is Common in Pregnancy: Experience from Antenatal Testing in Norway. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145519, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145519>

FOULON, W. Congenital toxoplasmosis: is screening desirable? **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 84 (Suppl.), p. 11-17, 1992.

FOULON, W.; NAESENS, A.; DERDE, M. P. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. **American Journal of Perinatology**, v. 11, p. 57-62, 1994.

<https://doi.org/10.1055/s-2007-994537>

FRANCO, P. S.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 838-844, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.012>

FRANCO, P. S. Infecção experimental de *Calomys callosus* pelas cepas brasileiras TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 de *Toxoplasma gondii* e avaliação da toxoplasmose congênita em fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49. 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Colegiado do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2013.

FRANCO, P. S.; DA SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; GOMES A. O.; IETTA, F.; SHWAB, E. K.; SU, C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 181, 2015.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00181>

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J. P.; GRIGG, M. E.; DE OLIVEIRA, F. C. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 33-39, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.030>

FRENKEL, J.K. Toxoplasmose. In: Veronesi, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo, SP: Guanabara Koogan, 2002.

FUGLEWICZ, A. J.; PIOTROWSKI, P.; STODOLAK, A. Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia: A review. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 26, n. 6, p. 1031-1036, 2017.  
<https://doi.org/10.17219/acem/61435>

FURTADO, J. M.; BHARADWAJ, A. S.; CHIPPS, T. J.; PAN, Y.; ASHANDER, L. M.; SMITH, J. R. *Toxoplasma gondii* tachyzoites cross retinal endothelium assisted by intercellular adhesion molecule-1 in vitro. **Immunology Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 912-915, 2012.  
<https://doi.org/10.1038/icb.2012.21>

GASHOUT, A.; AMRO, A.; ERHUMA, M.; AL-DWIBE, H.; ELMAIHUB, E.; BABBA, H.; NATTAH, N.; ABUDHER, A. 8. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in Libya. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 157, 2016.  
<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1491-5>

GILMAN, A. O. As bases farmacológicas da terapêutica .8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

GITLIN, D.; BIASUCCI, A. Development of gamma G, gamma A, gamma M, beta IC-beta IA, C 1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomucoid, beta-lipoprotein, alpha 2-macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 8, p. 1433-46, 1969.  
<https://doi.org/10.1172/JCI106109>

GOMEZ-LOPEZ, N.; ROMERO, R.; XU, Y.; MILLER, D.; LENG, Y.; PANAITESCU, B.; SILVA, P.; FARO, J.; ALHOUSSEINI, A.; GILL, N.; HASSAN, S. S.; HSU, C. D. The

immunophenotype of amniotic fluid leukocytes in normal and complicated pregnancies. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 4, p. e12827, 2018.  
<https://doi.org/10.1111/aji.12827>

HALL, S. M. Congenital Toxoplasmosis [Review]. **The BMJ**, v. 305, p. 291-297, 1992.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.305.6848.291>

HAMPTON, M. M. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Neonatal Network**, v. 34, n. 5, p. 274-8, 2015.  
<https://doi.org/10.1891/0730-0832.34.5.274>

HAUMONT, M.; DELHAYE, L.; GARCIA, L. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4948-53, 2000.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4948-4953.2000>

HEIKKINEN, J.; NEN, M. M. T.; PULKKI, K.; LASSILA, O.; ALANEN, A. Cytokine levels in midtrimester amniotic fluid in normal pregnancy and in the prediction of pre-eclampsia. **Journal of Immunology**, v. 53, p. 310-314, 2001.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2001.00872.x>

HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H. K.; DUNAY, I. R.; MOTER, A.; GESCHER, D. M.; SCHUMANN, R. R.; GOBEL, U. B.; LIESENFELD, O. Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8785-8795, 2006.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8785>

HOFFMAN, W.; LAKKIS, F. G.; CHALASANI, G. B Cells, Antibodies, and More. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 1, p. 137-54, 2015.  
<https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERCAMMEN, M. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 69-75, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8)

JONES, J. L.; KRUEGER, A.; SCHULKIN, J.; SCHANTZ, P. M. Toxoplasmosis prevention and testing in pregnancy, survey of obstetrician and gynaecologists. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 1, p. 27-33, 2009.  
<https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01277.x>

JONES, E. J.; KORCSMAROS, T.; CARDING, S. R. Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 1, 2017.  
<https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1273865>

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 149-156.

KHADEM VATAN, S.; FOROUTAN, M.; HAZRATI-TAPPEH, K.; DALVAND, S.; KHALKHALI, H.; MASOUMIFARD, S.; HEDAYATI-RAD, F. Toxoplasmosis in rodents: A systematic review and meta-analysis in Iran. **Journal of Infection and Public Health**, 2017  
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.01.021>

KHALIFA, K. EL-S.; ROTH, A.; ROTH, B.; ARASTEH, K. N.; JANITSCHKE, K. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2813-9, 1994.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L. D. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 3, 2009.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000404>

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>

KODJIKIAN, L. Toxoplasma and pregnancy. **Journal Français D'Ophthalmologie**, v. 33, n. 5, p. 362-367, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfo.2010.03.002>

LAI, M. Y.; LAU, Y. L. Screening and identification of host proteins interacting with *Toxoplasma gondii* SAG2 by yeast two-hybrid assay. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 456, 2017.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2387-y>

LAMBERT, H.; HITZIGER, N.; DELLACASA, I.; SVENSSON, M.; BARRAGAN, A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 19, p. 1611-1623, 2006.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x>

LETSCHER-BRU, V.; PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; FILISETTI, D.; ANTONI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6615-9, 2003.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6615-6619.2003>

LIU, W. G.; XU, X. P.; CHEN, J.; XU, Q. M.; LUO, S. L.; ZHU, X. Q. MIC16 gene represents a potential novel genetic marker for population genetic studies of *Toxoplasma gondii*. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 101, 2016.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0726-3>

LOPES, C. S.; FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; SILVA, D. A.; FERRO, E. A.; PENA, H. F.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R.; Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 9, p. 1865-1875, 2016.  
<https://doi.org/10.1017/S0950268815003295>

LOPES-MARIA, J. B. Modulação da apoptose em células BeWo infectadas por cepas atípicas (Udi1CH-05 e Udi2CH-05) de *Toxoplasma gondii*, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 2013. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

MARTINEZ-GOMEZ, F.; GARCIA-GONZALEZ, L. F.; MONDRAGON-FLORES, R.; BAUTISTA-GARFIAS, C. R. Protection against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation in mice immunized with *Toxoplasma gondii* cytoskeleton proteins and *Lactobacillus casei* as adjuvant. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 4, p. 311-315, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.017>

MARTINS, F. D. C.; NINO, B. S. L.; MONICA, T. C.; FERREIRA, F. P.; CORTELA, I. B.; SIGNORI, A. P.; MEDICI, K.C.; GONÇALVES, S. M. O.; RAMOS, L.; SILVA, C. R.; MENEGOLLA, I. A.; GALLARRETA, F. M. P.; PACHECO, L.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A.; PORTELLA, L. P.; MINUZZI, C. E.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; BREGANÓ, R. M.; GARCIA, J. L. Genotipagem de *Toxoplasma gondii* de isolados clínicos e uma amostra ambiental positiva durante o Surto de Santa Maria/RS. In: RBPT - IV Simpósio Brasileiro de Toxoplasmose, 67, 2018, Brasília. Anais... Brasília, 2018. p. 30.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D.; SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 487-95, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.08.001>

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**. v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINEO, J. R.; MCLEOD, R.; MACK, D.; SMITH, J.; KHAN, I. A.; ELY, K. H.; KASPER, L. H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **The Journal of Immunology**, v. 150, p. 3951-3964, 1993.

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**, v.79, n. 1, p. 11-20, 1994  
<https://doi.org/10.1006/expr.1994.1054>

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, p. 7, 2017.  
<https://doi.org/10.1186/s41182-017-0048-7>

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MONTOYA, J. G. Systematic screening and treatment of toxoplasmosis during pregnancy: is the glass half full or half empty? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 219, n. 4, p. 315-319, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.08.001>

MORRISSETTE N. S.; SIBLEY L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 21-38, 2002  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>

MOSE, J. M.; KAMAU, D. M.; KAGIRA, J. M.; MAINA, N.; NGOTHO, M.; NJUGUNA, A.; KARANJA, S. M. Development of Neurological Mouse Model for Toxoplasmosis Using *Toxoplasma gondii* Isolated from Chicken in Kenya. **Pathology Research International**, v. 2017, n. p. 1-8, 2017.  
<https://doi.org/10.1155/2017/4302459>

MOTA, C. M.; CHEN, A. L.; WANG, K.; NADIPURAM, S.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHEGEL, J. A.; MINEO, T. W. P.; BRADLEY, P. J. New molecular tools in *Neospora caninum* for studying apicomplexan parasite proteins. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3768, 2017.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03978-1>

MUMCUOGLU, I.; TOYRAN, A.; CETİN, F.; COSKUN, F.A.; BARAN, I.; AKSU, N.; AKSOY, A. Evaluation of the toxoplasmosis seroprevalence in pregnant women and creating a diagnostic algorithm. **Mikrobiyoloji Bülteni**, v. 48, n. 2, p. 283-291, 2014.  
<https://doi.org/10.5578/mb.7000>

MUSSAP, M.; FANOS, V.; PICCOLI, A.; ZANINOTTO, M.; PADOVANI, E. M.; PLEBANI, M. Low molecular mass proteins and urinary enzymes in amniotic fluid of healthy pregnant women at progressive stages of gestation. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 51-6, 1996.  
[https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02006-3](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02006-3)

NAGEL, S. D.; BOOTHROYD, J. C. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 10, p. 5569-74, 1989

NIEWIESK S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 446, 2014.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00446>

NINO, B. S. L.; MONICA, T. C.; MARTINS, F. D. C.; FERREIRA, F. P.; CORTELA, I. B.; SIGNORI, A. P.; MEDICI, K.C.; GONÇALVES, S. M. O.; RAMOS, L.; SILVA, C. R.; MENEGOLLA, I. A.; GALLARRETA, F. M. P.; PACHECO, L.; DIFANTE, C. M.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A.; PORTELLA, L. P.; MINUZZI, C. E.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; BREGANÓ, R. M. Surto de toxoplasmose em Santa Maria - RS: isolamento e teste de virulência. In: RBPT - IV Simpósio Brasileiro de Toxoplasmose, 66, 2018, Brasília. Anais... Brasília, 2018. p. 45.

OLIVEIRA, A. C. M. Isótipos de anticorpos específicos a *Toxoplasma gondii* presentes em amostras de leite humano: uma ferramenta para o diagnóstico de toxoplasmose aguda. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2013.

ORÉFICE, F.; FILHO, R. C.; BARBOZA, A. L.; ORÉFICE, J.; L.; CALUCCI, D. Toxoplasmose ocular adquirida Toxoplasmose ocular pós-natal. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 69, n. 3, p. 184-207, 2010.  
<https://doi.org/10.1590/S0034-72802010000300009>

OVCARIKOVA, J.; LEMGRUBER, L.; STILGER, K. L.; SULLIVAN, W. J.; SHEINER, L. Mitochondrial behaviour throughout the lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Scientific Reports**, v. 16, n. 7, 2017.  
<https://doi.org/10.1038/srep42746>

PARK, Y. K.; NAM, H. W. Early recognized antigen (p34) of *Toxoplasma gondii* after peroral ingestion of tissue cyst forming strain (Me49 strain) in mice. **Korean Journal of Parasitology**, v. 37, n. 3, p. 157-62, 1999.  
<https://doi.org/10.3347/kjp.1999.37.3.157>

PARMLEY, S. F.; SGARLATO, G. D.; MARK, J.; PRINCE, J. B.; REMINGTON, J. S. Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1127-33, 1992.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561-569, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>

PENA, H. F.; MARVULO, M. F.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P. A.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 377-381, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.015>

PERNI, S. C.; PREDANIC, M.; CHO, J. E.; KALISH, R. B.; CHASEN, S. T. Association of amniotic fluid index with estimated fetal weight. **Ultrasound Medicine**, v. 23, n. 11, p. 1449-1452, 2004.  
<https://doi.org/10.7863/jum.2004.23.11.1449>

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 12, n. 6, p. 214-223, 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.011>

PINARD, J. A.; LESLIE, N. S.; IRVINE, P. J. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 48, n. 5, p. 308-316, 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S1526-9523\(03\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S1526-9523(03)00279-4)

PITTMAN, K. J.; KNOLL, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 4, p. 387-401, 2015.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-15>

POMARES, C. AND MONTOYA, J.G. Laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 2016.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00487-16>

PRUSA, A. R.; HENGSTSCHLÄGER, M. Amniotic fluid cells and human stem cell research - a new connection. **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 11, p. 253-257, 2002.

QUAN, C. P.; FORESTIER, F.; BOUVET, J. P. Immunoglobulins of the human amniotic fluid. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 42, n. 4, p. 219-25, 1999.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1999.tb00094.x>

RAMACHANDRA, D. L.; SHAW, S. S. W.; SHANGARIS, P.; LOUKOGEORGAKIS, S.; GUILLOT, P. V.; COPPI, P. D.; DAVID, A. L. In utero therapy for congenital disorders using amniotic fluid stem cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 2014.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00270>

REMYNTOON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 941-945. 2004.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.941-945.2004>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-96, 2012.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

ROOPENIAN, D. C.; AKILESH, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 715-725. 2007.  
<https://doi.org/10.1038/nri2155>

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458-472, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.10.006>

ROSSI, B.; MERLO, B.; COLLEONI, S.; IACONO, E.; TAZZARI, P. L.; RICCI, F.; LAZZARI, G.; GALLI, C. Isolation and in vitro characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells at different trimesters of pregnancy. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 10, n. 5, p. 712-724, 2014.  
<https://doi.org/10.1007/s12015-014-9525-0>

RUIZ-ROSADO, J. D.; OLGUÍN, J. E.; JUÁREZ-AVELAR, I.; SAAVEDRA, R.; TERRAZAS, L. I.; ROBLEDO-AVILA, F. H.; VAZQUEZ-MENDOZA, A.; FERNÁNDEZ, J.; SATOSKAR, A. R.; PARTIDA-SÁNCHEZ, S.; RODRIGUEZ-SOSA, A. MIF Promotes Classical activation and conversion of inflammatory Ly6Chigh monocytes into TipDCs during murine toxoplasmosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1-18, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/9101762>

SAHINOGLU KESKEK, N.; UNAL, F.; CEVHER, S.; KESKEK, S. O. Causes of visual impairment in patients with ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 2, p. 192-195, 2017.

<https://doi.org/10.3855/jidc.7138>

SANDERS, A. P.; DOS SANTOS, T.; FELIPE, C. K.; ESTEVAO, M. L.; CICERO, C.; EVANGELISTA, F.; MANRIQUE, C. A.; MIZUTANI, A. S.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Ocular Lesions in Congenital Toxoplasmosis in Santa Isabel Do Ivai - Parana - Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 2017.

<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001614>

SANTANA, S. S.; GEBRIM, L. C.; CARVALHO, F. R.; BARROS, H. S.; BARROS, P. C.; PAJUABA, A. C.; MESSINA, V.; POSSENTI, A.; CHERCHI, S.; REICHE, E. M.; NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L.; POZIO, E.; MINEO, T. W.; SPANO, F.; MINEO, J. R. CCp5A protein from *Toxoplasma gondii* as a serological marker of oocyst-driven infections in humans and domestic animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1305, 2015.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01305>

SCHREINER, M.; LIESENFELD, O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: review of 70 reports from the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 221-233, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200015>

SERRANTI, D.; BUONSENSO, D.; VALENTINI, P. Congenital toxoplasmosis treatment. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 2, p. 193-198, 2011.

SHIBY, V. K.; MISHRA, H. N. Fermented milks and milk products as functional foods--a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 482-496, 2013.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.547398>

SHWAB, E. K.; ZHU, X. Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F. J.; 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.

<https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>

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 of London. **Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087>

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 72-91, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x>

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.

<https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>

SKOTARCZAK, B. I. The role of ticks in transmission cycle of *Toxoplasma gondii*. **Annals of Parasitology**, v. 62, n. 3, p 185-191, 2016.

SMIT, G. S. A.; PADALKO, E.; VAN ACKER, J.; HENS, N.; DORNY, P.; SPEYBROECK, N.; DEVLEESSCHAUWER, B. Public Health Impact of Congenital Toxoplasmosis and Cytomegalovirus Infection in Belgium, 2013: A Systematic Review and Data Synthesis. **Clinical Infectious Diseases**, 2017.

<https://doi.org/10.1093/cid/cix344>

SOARES, L. L. Estrutura e Formação do Cisto Tecidual de *Toxoplasma gondii*. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)) - Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.

SOARES, R. M.; SILVEIRA, L. H.; DA SILVA, A. V.; RAGOZO, A.; GALLI, S.; LOPES, E. G.; GENNARI, S. M.; DE JESUS PENA, H. F. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 29-34, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.037>

SPINLER, J. K.; ROSS, C. L.; SAVIDGE, T. C. Probiotics as adjunctive therapy for preventing *Clostridium difficile* infection - What are we waiting for? **Anaerobe**, v. 41, p. 51-57, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.007>

SU, C., KHAN, A., ZHOU, P., MAJUMDAR, D., AJZENBERG, D., DARDE, M.L., ZHU, X.Q., AJIOKA, J.W., ROSENTHAL, B.M., DUBEY, J.P., SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 5844-5849, 2012.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

TALABANI, H.; MERGEY, T.; YEAR, H.; DELAIR, E.; BRÉZIN, A.P.; LANGSLEY, G.; DUPOUY-CAMET J. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. **Parasite**, v. 17, n. 3, p. 177-182, 2010.

<https://doi.org/10.1051/parasite/2010173177>

TOELLNER, K. M.; LUTHER, S. A.; SZE, D. M.; CHOY, R. K.; TAYLOR, D. R.; MACLENNAN, I. C.; ACHA-ORBEA, H. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 8, p. 1193-204, 1998.

<https://doi.org/10.1084/jem.187.8.1193>

UENO, N.; LODOEN, M. B. From the blood to the brain: avenues of eukaryotic pathogen dissemination to the central nervous system. **Current Opinion in Microbiology**, v. 26, p. 53-59, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.006>

VALDÈS, V.; LEGAGNEUR, H.; WATRIN, V.; PARIS, L.; HASCOËT, J. M. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **Archives de Pédiatrie**, v. 18, n. 7, p. 761-3, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.arcped.2011.04.011>

VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R. Jr.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 2, p. 350-351, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2004.07.040>

VILLARD, O.; CIMON, B.; L'OLLIVIER, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; GODINEAU, N.; HOUZE, S.; PARIS, L.; PELLOUX, H.; VILLENA, I.; CANDOLFI, E. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 22-33, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009>

VON KLITZING, E.; EKMEKCIU, I.; KUHL, A. A.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, WAHAB, T., EDVINSSON, B., PALM, D., LINDH, J. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, p591-2, 2010.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01113-09>

WALLON, M.; GARWEG, J. G.; ABRAHAMOWICZ, M.; CORNU, C.; VINAULT, S.; QUANTIN, C.; BONITHON-KOPP, C.; PICOT, S.; PEYRON, F.; BINGUET, C. Ophthalmic outcomes of congenital toxoplasmosis followed until adolescence. **Pediatrics**, v. 133, n. 3, p. e601-8, 2014.

<https://doi.org/10.1542/peds.2013-2153>

WANG, Y.; YIN, H. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 7, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-180>

WILHELM, C. L.; YAROVINSKY, F. Apicomplexan infections in the gut. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 9, p. 409-420, 2014.

<https://doi.org/10.1111/pim.12115>

WOHLFERT, E. A.; BLADER, I. J.; WILSON, E. H. Brains and Brawn: Toxoplasma Infections of the Central Nervous System and Skeletal Muscle. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 519-531, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.001>

XIAO, J.; YOLKEN, R. H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiologica (Oxf)**, v. 213, n. 4, p. 828-845, 2015.

<https://doi.org/10.1111/apha.12458>

YAN, C.; LIANG, L. J.; ZHENG, K. Y.; ZHU, X. Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 137, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1432-6>

YAROVINSKY F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109-121, 2014.

<https://doi.org/10.1038/nri3598>

YUKITAKE, H.; TAKIZAWA, M.; KIMURA, H. Macrophage Migration Inhibitory Factor as an Emerging Drug Target to Regulate Antioxidant Response Element System. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

<https://doi.org/10.1155/2017/8584930>

ZWEMER L. M. AND BIANCHI D.W. The amniotic fluid transcriptome as a guide to understanding fetal disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2015.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023101>



*Anexo I*

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS DA UFU



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Isolamento e caracterização genotípica de *Toxoplasma gondii* em líquido amniótico e placenta humana.

**Pesquisador:** José Roberto Mineo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 46669115.9.0000.5152

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.289.995

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 21 de Outubro de 2015

Assinado por:

**Sandra Terezinha de Farias Furtado**  
(Coordenadora)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Profª Drª Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora

Número do Parecer: 1.289.995

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o pesquisador, *Toxoplasma gondii* é um parasita oportunista que causa doenças em indivíduos com deficiência de imunidade celular, especialmente em indivíduos com deficiência de linfócitos T. O presente projeto tem como objetivo isolar e caracterizar genotípicamente o parasita em líquido amniótico e placenta humana. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU em 2014.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

**Bairro:** Santa Mônica

**CEP:** 38.408-144

**UF:** MG

**Município:** UBERLÂNDIA

**Telefone:** (34)3239-4131

**Fax:** (34)3239-4335

**E-mail:** cep@propp.ufu.br



*Anexo II*

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar da pesquisa chamada **“Isolamento e caracterização genotípica de *Toxoplasma gondii* em líquido amniótico e placenta humana”** sob responsabilidade dos pesquisadores: Lucas Vasconcelos Soares Costa; Priscila Silva Franco; Angélica Lemos Debs Diniz; Márcia Aires Rodrigues de Freitas; Deivid William da Fonseca Batistão; Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba; Kleber Simônio Parreira; Tiago Wilson Patriarca Mineo; Eloisa Amália Vieira Ferro; José Roberto Mineo.

Nesta pesquisa estamos buscando identificar novas cepas de *T. gondii* presentes em nossa região pelo isolamento e genotipagem do parasito em amostras de líquido amniótico (LA) e placenta de gestantes com toxoplasmose atendidas no atendias no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).

Na sua participação você fornecerá uma amostra do líquido amniótico e a placenta após o parto. A coleta do líquido amniótico oferece risco à gestação, uma vez que é um processo invasivo. Por outro lado, a amniocentese será realizada por médico especializado neste tipo de procedimento diminuindo assim os riscos de aborto. Caso você e o seu bebê forem diagnosticados com toxoplasmose, receberão acompanhamento e tratamento sem ônus. Já a placenta, será coletada logo após o seu parto e isso não trará prejuízos para sua saúde ou para a saúde de seu filho, uma vez que este material será normalmente expulso pelo seu organismo. Caso a placenta não fosse utilizada para esta pesquisa seria descartado após o parto. A amostra de líquido amniótico e a placenta será entregue pela equipe da obstetria para a Dra. Priscila Silva Franco ou para Lucas Vasconcelos Soares Costa para conduzir a pesquisa.

Além da coleta do material, você também autoriza que os pesquisadores tenham livre acesso à sua ficha médica para sabermos se você possui toxoplasmose ou outra infecção que possa comprometer a interpretação dos resultados. Os dados que serão coletados: sorologia para IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii*, idade, idade gestacional, data do parto, tratamento, sintomas maternos, resultados de PCR.

Esta pesquisa trará futuros benefícios para mães e filhos com toxoplasmose, pois permitirá a avaliação do tratamento contra a doença, além de obtermos dados epidemiológicos sobre as cepas de *T. gondii* presentes em nossa região.

Em nenhum momento você será identificada. Os resultados da pesquisa serão publicados e, ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar da pesquisa.

A senhora é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para senhora ou para seu filho. Uma cópia deste Termo livre e Esclarecido ficará com a senhora.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa a senhora poderá entrar em contato com os pesquisadores:

- Lucas Vasconcelos Soares Costa, Laboratório de Imunoparasitologia, Universidade Federal de Uberlândia – Campus Umuarama - Bloco 4C, Telefone: 3218-2195/ Fax: 3225-8668

-Priscila Silva Franco, Laboratório de Histologia – ICBIM, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama – Bloco 2B Telefone/Fax: 2225-8569

- Eloisa Amália Vieira Ferro, Laboratório Histologia – ICBIM, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama – Bloco 2B Telefone/Fax: 2225-8569

- José Roberto Mineo, Laboratório de Imunoparasitologia, Universidade Federal de Uberlândia – Campus Umuarama - Bloco 4C, Telefone: 3218-2195/ Fax: 3225-8668

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres- Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, --- de --- de ----.

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Assinatura da participante da pesquisa

---

Assinatura do pesquisador