

JANAINA LOBATO



**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-
Neospora caninum EM DIFERENTES GRUPOS
DE PACIENTES IMINODEPRIMIDOS**

Uberlândia - MG

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Janaina Lobato

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Neospora*
caninum EM DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES
IMUNODEPRIMIDOS**

Uberlândia – MG

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Janaina Lobato

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Neospora*
caninum EM DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES
IMUNODEPRIMIDOS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e Imunologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia – MG

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

L796d Lobato, Janaina, 1981-
Detecção de anticorpos IgG ANTI-*Neospora caninum* em diferentes
grupos de pacientes imunodeprimidos / Janaina Lobato. - Uberlândia,
2006.
67 f. : il.
Orientador: José Roberto Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Doenças parasitárias - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Universi-
dade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU:616.99

*"Nunca abra mão de seus sonhos,
pois se eles morrerem, a vida se torna igual
a um pássaro de asa quebrada:
não consegue voar."*

Langston Hughes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e a todas as pessoas que Deus colocou em minha vida para me ensinar o dom do amor e da paciência.

AGRADECIMENTOS

Á Deus que sempre foi minha força e minha paz interior, que sempre esteve ao meu lado me fortificando todas as vezes que me senti fraca frente as dificuldades encontradas. Ele sempre me deu a mão e com sua ajuda Ele me trouxe até aqui.

Aos meus pais, Eurípedes Faria Lobato e Vanda Maria Lobato, que me deram a oportunidade de viver, por terem me amado e me dado a oportunidade de realizar este mestrado. Obrigado por tudo que me ofereceram, e este é um dos resultados da nossa batalha juntos.

Aos meus irmãos Lucas Faria Lobato, Vanessa Lobato e Regislaine Lobato, por estarem ao meu lado, por fazendo parte da nossa família.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Mineo, que me aceitou e acreditou no meu trabalho. Pelo apoio e incentivo dados para a realização deste trabalho de pesquisa.

À Deise Aparecida Oliveira Silva, o meu muito obrigado pela dedicação, pela paciência, pelo amor, pelos ensinamentos que sempre foram presentes em todos os dias dedicados a esta pesquisa. Não tenho palavras pra agradecer por tudo que você me ensinou. Fica aqui todo meu carinho e gratidão.

Ao Dr. Heleno Batista de Oliveira, pelo apoio dado a esta pesquisa. Obrigado pela ajuda na seleção de pacientes, pelo apoio intelectual, por acreditar neste trabalho e pelo incentivo de todos os momentos.

A todos os pacientes que colaboraram com esta pesquisa, que deixaram para mim um exemplo a ser seguido, que por mais árdua que seja a vida podemos sempre contribuir com algo presente nela.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas, pela compreensão, apoio e amizade.

A todos os meus amigos do Laboratório de Imunologia, agradeço pelos sorrisos, pelo apoio, pelos incentivos, por sempre estarem dispostos a ajudarem. Obrigado por tudo, vocês ficaram sempre guardados em minhas boas lembranças.

Ao Tiago W.P. Mineo, pelo apoio e incentivo nesta pesquisa.

Ao secretário José Neto e Lucineide, secretários do Programa de Pós-Graduação pelo apoio administrativo.

A todos os meus colegas da pós-graduação, que juntos construímos um ambiente agradável e repleto de conhecimentos. Foi excelente conhecer todos vocês.

Ao meu namorado, Gustavo Parreira de Santana, pelo carinho, compreensão, apoio dado em todos os dias. E principalmente por tudo que você me ofereceu nesta última etapa.

As minhas grandes e eternas amigas, Isabella Saraiva Pereira da Silva, Adriana de Fátima Costa e Juliana Oliveira da Costa, obrigada por tudo que vocês fizeram por mim, pela presença de vocês em minha vida, pela ajuda nesta tese e pelo apoio em minha vida. Amo muito vocês.....

E a todos que colaboraram diretamente ou indiretamente na realização deste projeto, obrigada a todos vocês.

SUMÁRIO

	Página
1.0 Introdução	16
1.1 Histórico.....	16
1.2 Formas Evolutivas.....	17
1.3 Ciclo Biológico.....	18
1.4 Hospedeiros.....	19
1.5 Meios de transmissão.....	19
1.6 Patogenia.....	20
1.7 Resposta Imune.....	21
1.8 Diagnóstico.....	22
1.9 Infecção na espécie humana.....	23
1.10 Imunodepressão na espécie humana.....	24
2.0 Objetivos.....	29
3.0 Materiais e métodos.....	30
3.1 Pacientes e amostras de soro.....	30
3.2 Submissão ao comitê de ética.....	31
3.3 Parasitos.....	31
3.3.1 <i>Neospora caninum</i>	31
3.3.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	31
3.4 Antígenos de <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>	32
3.4.1 Antígenos Solúveis.....	32
3.4.2 Antígenos íntegros.....	32
3.5 Testes sorológicos.....	33
3.5.1 ELISA.....	33
3.5.2 IFAT.....	34
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.....	34
3.7 <i>Western Blott</i>	35
3.8 Análise de questionários e prontuários.....	36

3.9	Análise estatística.....	36
3.10	Normas de biossegurança.....	36
4.0	Resultados.....	37
5.0	Discussão.....	46
6.0	Conclusões.....	53
7.0	Referências Bibliográficas.....	54
	Anexos.....	61
	Anexo 1.....	61
	Anexo 2.....	62

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. José Roberto Mineo e com o auxílio financeiro da CNPq, FAPEMIG e CAPES.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo de vida de *N. caninum*.

Figura 2. Resultados da sorologia por ELISA, IFAT e WB para anticorpos IgG anti- *T. gondii* entre os cinco grupos analisados.

Figura 3. Soropositividade global para anticorpos anti-*N. caninum* em pacientes portadores do HIV, transplantados, oncológicos, hemodiálise e doadores de sangue.

Figura 4. Figura representativa do teste de *Western blot* nos diferentes grupos.

Figura 5. Frequência de bandas antigênicas do *N. caninum* em soros da espécie humana.

Tabela 1. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detectar anticorpos IgG anti-*N. caninum* em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana.

Tabela 2. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em pacientes transplantados em relação à sorologia para *T. gondii*.

Tabela 3. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em pacientes oncológicos em relação à sorologia para *T. gondii*.

Tabela 4. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em pacientes em hemodiálise em relação à sorologia para *T. gondii*.

Tabela 5. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detectar anticorpos IgG anti-*N. caninum* em doadores de sangue em relação à sorologia para *T. gondii*.

Tabela 6. Soropositividade a *T. gondii* e *N. caninum* por ELISA, IFAT e IB em diferentes grupos de pacientes.

Tabela 7. Relação da sorologia de diversos patógenos em pacientes portadores do vírus HIV soropositivos para *N. caninum*.

RESUMO

Pouco se sabe sobre a epidemiologia da infecção pelo *N. caninum* na espécie humana, particularmente, na população com altas taxas de infecção a *T. gondii*. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de anticorpos anti- *N. caninum* em pacientes imunodeprimidos. Um total de 331 amostras de soros provenientes de 5 grupos de indivíduos (65 pacientes HIV positivos, 62 pacientes transplantados, 87 pacientes apresentando neoplasias, 53 pacientes em processo de hemodiálise e 64 doadores de sangue) foi avaliado quanto a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* pelos testes imunofluorescência (IFAT), imunoenzimático (ELISA) e *Western blot* (WB). Anticorpos IgG anti-*N. caninum* foram predominantemente detectados em pacientes HIV positivos (28%), enquanto que taxas de soropositividade menores foram encontradas nos demais grupos: pacientes oncológicos (13%), em hemodiálise (11%), transplantados (7%) e doadores de sangue (5%). Soropositividade para *N. caninum* foi significativamente associada com a soropositividade para *T. gondii* nos grupos de pacientes HIV positivos, oncológicos e em hemodiálise. A sororeatividade para *N. caninum* foi confirmada quando duas de três proteínas imunodominantes (17, 29 e 35 kDa) deste parasito foram reconhecidas nas amostras de soros pelo teste WB. Os resultados deste estudo indicaram uma maior taxa de soroconversão em pacientes imunodeprimidos quando expostos ao *N. caninum*, principalmente em pacientes HIV positivos. Esta soroconversão a *N. caninum* pode ser resultante de uma infecção oportunística e/ou recorrente, como ocorre também na infecção a *T. gondii*. Estes resultados revelam uma nova preocupação com pacientes imunodeprimidos que podem estar, de alguma forma, mais susceptíveis a desenvolverem infecções oportunistas por *N. caninum*.

Palavras chaves: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, HIV, Imunodeprimidos

ABSTRACT

Little is known about the epidemiology of *N. caninum* infection in humans, particularly in populations with high *T. gondii* infection rates. This study aimed to investigate the presence of antibodies to *N. caninum* in *Toxoplasma*-seropositive and -seronegative individuals. Serum samples from 331 individuals were tested for the presence of IgG antibodies against *N. caninum* and *T. gondii* by indirect fluorescent antibody test (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot (WB). Serum samples were divided into 5 groups, as follows: 65 from HIV-positive patients; 62 from allograft transplantation patients; 87 from cancer patients; 53 from hemodialysis patients; and 64 from blood donors. Seroreactivity to *N. caninum* was confirmed by WB, and the criterion for positivity was the sera recognition of at least two out of three immunodominant antigens (17, 29 e 35 kDa) from the parasite. Seropositivity to *N. caninum* was predominantly seen in HIV-patients (28%), whereas significantly low seropositivity was detected in blood donors (5%). Intermediate rates were seen in cancer (13%), hemodialysis (11%), and allograft transplantation (7%) patients. Seropositivity to *N. caninum* in the three groups with higher seropositivity rates was significantly associated with seropositivity to *T. gondii*. The results of this study indicate the presence of *N. caninum* exposure and seroconversion in humans, particularly in HIV patients, who could have opportunistic and concurrent infections with *T. gondii*. These findings may bring a new concern for the unstable clinical health of HIV patients and the actual role of *N. caninum* infection in immunocompromised patients.

Key words: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, HIV, immunocompromised

INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Neospora caninum foi primeiramente reconhecido em 1984, em um cão da raça labrador com encefalomielite. Este animal foi infectado por um parasito coccídeo formador de cistos, como o *Toxoplasma*, mas não reagia sorologicamente a este (BJERKAS, MOHN & PRESTHUS, 1984).

Até 1988, anteriormente à descrição de *N. caninum*, algumas infecções em animais eram diagnosticadas erroneamente como toxoplasmose, mas em 1988 Dubey e colaboradores descreveram pela primeira vez a morfologia do parasito e neste mesmo ano estes dois parasitos foram diferenciados ultraestruturalmente (BJERKAS & PRESTHUS, 1988).

N. caninum se assemelha morfologicamente a *T. gondii*, mas difere em características estruturais, filogenéticas, antigênicas, taxonômicas e em vários outros aspectos biológicos (DUBEY, 1999). Três características foram avaliadas para separar estas duas espécies que pertencem à subclasse Coccidia. O primeiro critério refere-se à paralisia que ocorre principalmente nos membros posteriores dos cães durante a fase aguda, síndrome não observada em animais com diagnóstico confirmado de toxoplasmose. A outra característica é a diferença morfológica entre os cistos teciduais destas espécies e finalmente, os anticorpos contra *T. gondii* não são encontrados em alguns cães com suspeita de neosporose (DUBEY, BARR & BARTA, 2002).

Somente em 1998 ficou estabelecido que o hospedeiro definitivo do *N. caninum* é o cão, isolando-se oocistos presentes nas fezes deste animal. Antes ele era considerado um dos hospedeiros intermediários deste parasito (McALLISTER et al., 1998a). Em 2004 foi confirmado que coiotes eliminam oocistos de *N. caninum* quando ingerem tecidos de bovinos infectados. Estes animais também foram considerados hospedeiros definitivos do parasito, fazendo parte de um ciclo silvestre (GONDIN, et al., 2004a).

Hoje se sabe que existem vários hospedeiros intermediários como os bovinos, ovinos, caprinos e vários outros animais homeotérmicos, sendo eles domésticos ou selvagens, além dos seres humanos (GONDIM, et al., 2004a, TRANAS, et al., 1999; NAM, KANG & CHOI, 1998; LOBATO, et al., 2006).

N. caninum desenvolveu estratégias de sobrevivência e perpetuação baseadas em uma relação harmônica com seus hospedeiros. Trabalhos de filogenia vêm demonstrando claramente que *N. caninum* pertence a um clado diferente do *T. gondii*, além disso, *N. caninum* possui um maior tempo de evolução que *T. gondii*, o que provavelmente lhe confere uma melhor adaptação aos seus hospedeiros (SLAPETA et al., 2002).

1.2 As formas de vida

N. caninum possui três formas de vida distintas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas.

As formas taquizoítas de *N. caninum* têm formato ovalado, lunar ou globular, medem 3-7 x 1-5 µm, dependendo do estágio de divisão. São parasitos intracelulares obrigatórios e podem estar presentes em vários tipos de células. Eles são encontrados dentro de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula hospedeira e cada taquizoíta contém de 6 a 16 roptrias que possuem conteúdos eletrondensos (DUBEY, BARR & BARTA, 2002). Os taquizoítas possuem uma multiplicação rápida (do grego *tachys* = rápido) e a sua presença no organismo do hospedeiro indica fase aguda ou proliferativa da infecção, transformando-se, a seguir, em bradizoítas.

Os bradizoítas apresentam multiplicação lenta (do grego *bradys* = lento), possuem forma alongada, com um núcleo sub-terminal medindo aproximadamente 8 x 2 µm. Os bradizoítas contêm organelas tipicamente encontradas em outros coccídios, contendo grandes e pequenos grânulos densos, roptrias e micronemas, sendo estas muitas vezes posicionadas perpendicularmente ao plasmalema (DUBEY, BARR, & BARTA, 2002). E com sua multiplicação mais lenta, o parasito passa a secretar componentes de natureza protéica que formam uma parede que os envolve, formando cistos teciduais onde estão localizados.

Os cistos teciduais de *N. caninum* são encontrados primariamente em tecidos neurais, mas também podem ser encontrados em músculos (PETERS et al., 2001). A parede do cisto geralmente apresenta acima de 4 µm de espessura, com um contorno ondulado na seção tecidual, mas sem protrusões.

Os oocistos de *N. caninum* são formas infectantes, geralmente com tamanho de 11,7 x 11,3 µm, são transparentes e possuem de 0,6 a 0,8 µm de espessura. Estes

geralmente possuem dois esporocistos onde cada esporocisto contém quatro esporozoítas e um resíduo. Os esporozoítas são alongados e têm geralmente 6,5 x 2 µm de tamanho (DUBEY, BARR, & BARTA, 2002).

1.3 O ciclo biológico

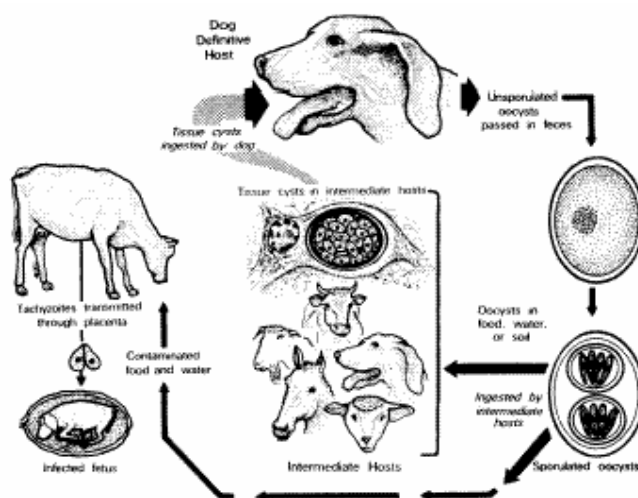


Figura 1. Ciclo de vida de *N. caninum* (Dubey, 1999).

O ciclo biológico deste parasito envolve hospedeiro definitivo e intermediário caracterizando-se, portanto, em um ciclo heteroxeno, no qual a fase assexuada ocorre no hospedeiro intermediário e a sexuada ocorre no hospedeiro definitivo (DUBEY, 1999).

Nos hospedeiros intermediários, *N. caninum* sofre duas fases de desenvolvimento assexuado: na primeira fase, os tachizoítas multiplicam-se por endodiogenia, dentro de vacúolos parasitóforos em diferentes tipos de células hospedeiras. Divisões sucessivas levam à formação de pseudocistos que se rompem e tachizoítas da última geração iniciam a segunda fase de desenvolvimento. Nesta, ocorre a formação de cistos teciduais, pela multiplicação dos bradizoítas por endodiogenia, que se estabelecem nos tecidos neurais e músculos esqueléticos (DUBEY, 1999). Os bradizoítas representam uma fase persistente de infecção quiescente, devido a uma checagem realizada pela imunidade do hospedeiro.

Os cães podem entrar em contato com o parasito ingerindo cistos presentes em tecidos de hospedeiros intermediários. No intestino, o parasito passará pela fase sexuada, que ainda não é completamente entendida. A partir deste momento o hospedeiro definitivo pode eliminar um pequeno número oocistos nas fezes

(McALLISTER et al., 1998a; LINDSAY UPTON & DUBEY, 1999; LINDSAY, RITTER & BRAKE, 2001). Cães infectados a partir de tecidos bovinos eliminam 30 vezes mais oocistos do que aqueles infectados com tecidos murinos (GONDIM, GAO & McALLISTER, 2002).

Os oocistos eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo passarão por um processo de esporulação dentro de três dias, tornando-se formas infectantes que podem contaminar o ambiente. (DUBEY, BARR & BARTA, 2002).

1.4 Os hospedeiros

Sabe-se que o *N. caninum* possui um ciclo selvagem e um ciclo doméstico, sendo que nestes ambientes distintos as duas espécies de canídeos, que são os coiotes e os cães, liberam oocistos nas fezes (GONDIM et al., 2004a). Em 2004, Gondim e colaboradores observaram nos Estados Unidos cervídeos infectados naturalmente transmitem *N. caninum* para cães, por meio de carnivorismo. Baseando-se nestes dados acredita-se que possa existir um ciclo cruzado de animais entre o ciclo silvestre e doméstico neste local.

Ao redor dos hospedeiros definitivos uma ampla variedade de animais está exposta ao parasito. Devido a sua distribuição mundial, uma gama de espécies animais já foi relatada como hospedeiros intermediários: vacas, cabras, porcos, gatos, búfalos, alpacas, alces, ursos, ratos, lhamas, capivaras, raposas, cavalos, lobos-guará, veados, dentre outros (DUBEY, 2003).

1.5 Transmissão

Os meios de transmissão que o *N. caninum* utiliza para chegar aos seus hospedeiros geralmente ocorre por duas vias: horizontal ou vertical.

Na transmissão horizontal, os hospedeiros ingerem alimentos ou água contaminada com oocistos de *N. caninum*, esta via tem sido demonstrada viável somente em experimentos laboratoriais com camundongos (McALLISTER et al., 1998b). Esta forma de transmissão também pode acontecer quando animais ingerem cistos presentes em tecidos de qualquer hospedeiro intermediário. Nos cães, a transmissão horizontal ocorre principalmente quando ingerem cistos presentes no

sistema nervoso central (DUBEY, 1999; ANDERSON, ANDRIANARIVO & CONRAD, 2000) e em placentas infectadas de bovinos (PETERS et al., 2001).

A transmissão vertical ocorre por via materno - fetal, sendo que nesta a infecção pode ser recrudesciente ou primária. O parasito consegue romper a barreira transplacentária e atingir o feto. Até o momento sabe-se que este tipo de infecção é mais freqüente em bovinos, o que leva a vários problemas econômicos. Experimentalmente, camundongos podem ser infectados lactogenicamente (COLE et al., 1995a) e bezerros podem ser infectados oralmente por taquizoítas presentes no leite (UGGLA et al., 1998). *N. caninum* tem sido transmitido da mãe para o feto em bovinos (DUBEY et al., 1998; BARR et al., 1994), carneiros, (DUBEY & LINDSAY, 1990; BUXTON et al., 1997), cabras (LINDSAY et al., 1995), camundongos (COLE et al., 1995a; LONG & BASZLER, 1996; LIDDELL, JENKINS & DUBEY, 1999), cães (DUBEY & LINDSAY, 1989a; COLE et al., 1995b), gatos (DUBEY & LINDSAY, 1989b), macacos (BARR et al., 1994) e porcos (JENSEN et al., 1998).

Como na infecção por *T. gondii*, em que gatos liberam oocistos nas fezes podendo infectar humanos, acredita-se que as chances de exposição de humanos ao *N. caninum* sejam grandes, devido ao fato do homem ter um contato íntimo com o cão. A infecção pode ocorrer pela ingestão ou inalação de oocistos presentes no pêlo do animal ou ingerindo cistos contidos em carnes mal cozidas.

1.6 Patogenia

Em infecções de *N. caninum* que ocorrem naturalmente em vários hospedeiros, o mais comum é não visualizar lesões e nem apresentar uma anormalidade clínica óbvia, sendo a infecção geralmente subclínica. Quando a infecção ocorre congenitamente o resultado mais comum também é uma infecção subclínica, podendo haver abortos ou nascimento de animais mortos (geralmente em bovinos) que causa um dos maiores problemas econômicos gerado pelo parasito.

Nos cães com neosporose podem ocorrer sinais neurológicos que dependem do sítio parasitado, estes se expressam como hiperextensão rígida dos membros posteriores, dificuldade em deglutir, paralisia da mandíbula, flacidez e atrofia muscular e paralisia dos nervos faciais. Tem sido relatado também casos de dermatite, cardiomiopatia e pneumonia. Animais de qualquer idade podem ser infectados, mas aparentemente filhotes são mais acometidos, principalmente pela forma neurológica (DUBEY et al.,

1998, DUBEY, 1999). Geralmente os casos mais severos ocorrem em filhotes, infectados congenitamente. Estes cães desenvolvem paralisia dos membros posteriores que evolui de forma progressiva (DUBEY & LINDSAY, 1989a). A causa da hiperextensão dos membros provavelmente ocorre devido a uma combinação de paralisia do neurônio motor superior e miosite, que resulta em uma contratura fibrosa progressiva rápida dos músculos que podem causar a fixação dos joelhos. A doença pode ser localizada ou generalizada e virtualmente todos os órgãos podem estar envolvidos (DUBEY & LINDSAY, 1989a).

A patologia em bovinos tem sido revisada em vários trabalhos (WOUDA, 1997; DUBEY, 1999; ANDERSON, ANDRIANARIVO & CONRADE, 2000; DIJKSTRA, et al., 2002; INNES et al., 2002; DUBEY, 2003). *N. caninum* causa aborto em vacas e morte em bezerro neonatos. Vacas de qualquer faixa etária podem abortar com 3 meses de gestação a termo. Vários abortos induzidos pela neosporose ocorrem entre o 5 e 6 mês de gestação. Os fetos podem morrer no útero, serem mumificados, autolizados, ou nascerem sem sinais clínicos, mas infectados cronicamente. O aborto que acomete os bovinos acontece devido a uma alteração no balanço de citocinas. Não se sabe ainda ao certo como acontece essa regulação durante a gestação, mas certamente existem citocinas benéficas e prejudiciais neste processo. Na gestação ocorre uma situação interessante para o sistema imune, porque a fêmea carrega um corpo estranho, sem rejeição. Com isso ocorre uma mudança crucial no papel das citocinas na interface materno-fetal (INNES et al., 1995).

1.7 Resposta imune ao parasito

N. caninum, semelhante aos outros parasitos apicomplexas, é um patógeno intracelular obrigatório, devido a isto a resposta imune mediada por células é importante na imunidade protetora do hospedeiro contra este parasito.

Existem poucos estudos relatando a resposta imune de *N. caninum* em animais e nenhum deles na espécie humana. Os modelos geralmente estudados são os bovinos, e são através destes estudos que se conhece um pouco sobre a resposta imune do hospedeiro contra este parasito.

Sabe-se que anticorpos específicos e a resposta imune mediada por células estão envolvidos na proliferação celular e na produção de Interferon-gama (IFN- γ). Isto tem sido observado tanto em animais infectados naturalmente quanto experimentalmente

com oocistos ou taquizoítas. A presença de anticorpos específicos é útil tanto para o diagnóstico quanto para estudos epidemiológicos. Anticorpos efetivos têm o papel de auxílio no controle da infecção, neutralizando taquizoítas extracelulares e células infectadas expressando antígenos parasitários. Estudos têm mostrado que em células ruminantes com IFN- γ a multiplicação de *N. caninum* é significativamente inibida (INNES et al., 1995). Estudos *in vivo* têm demonstrado que camundongos com depleção dos genes de IL-12 ou IFN- γ e camundongos “knockout” para IFN- γ não sobrevivem à infecção por *N. caninum* (KHAN et al., 1997). Citocinas pro-inflamatórias como IL-2, IL-12 e IFN- γ são muito importantes para gerar uma resposta Th1 e são efetivas no controle da multiplicação *N. caninum*. Estas citocinas são potencialmente danosas pois podem levar a uma rejeição ou aborto do feto (RAUGHUPATHY, 1997).

1.8 Diagnóstico

Semelhante à infecção por *T. gondii*, a infecção por *N. caninum* leva a uma resposta humoral no indivíduo, que pode ser demonstrada em diferentes testes. Vários testes têm sido utilizados para colaborar no diagnóstico desta patologia.

No diagnóstico sorológico, o teste de referência utilizado para a detecção de anticorpos tem sido o IFAT, juntamente com outros testes que são utilizados para comparar os resultados com o teste de referência (BJORKMAN & UGGLA, 1999). No IFAT pode-se utilizar taquizoítas intactos que irão detectar anticorpos contra antígenos presentes na superfície do parasito. Este teste tem sido utilizado para detectar anticorpos de um grande número de espécies animais, incluindo cães, raposas, gatos, bovinos, porcos, cabras, búfalos, cavalos, roedores e primatas (BJORKMAN & UGGLA, 1999). Foram encontrados anticorpos fetais IgG, IgM e IgA pelo teste IFAT em macacos rhesus (BARR et al., 1994).

O teste ELISA utiliza uma preparação contendo um número significativo de antígenos, a maioria dos quais provavelmente de origem citoplasmática ou intracelular. Devido a este fato, a determinação da especificidade e sensibilidade deste teste tem sido objeto de várias investigações (BJORKMAN & UGGLA, 1999).

Os testes sorológicos ELISA, IFAT e *Western blot* tem sido também utilizados para se verificar a presença de anticorpos IgG na espécie humana (NAM, KONG & CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006).

Outros testes como imunohistoquímica (IHQ) e reação de cadeia em polimerase (PCR) têm auxiliado enormemente na confirmação do diagnóstico sorológico da neosporose.

1.9 Infecção na espécie humana

A presença de anticorpos contra *N. caninum* já foi descrita na espécie humana (NAM, KONG & CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999; MAGALHÃES et al., 2002; LOBATO et al., 2006). Um dos primeiros trabalhos que comprovou a presença de anticorpos contra o parasito na espécie humana foi realizado em 1999. Foram analisadas 1029 amostras de soros humanos advindos de doadores de sangue, observando-se que, utilizando o teste de imunofluorescência indireta, 6,7% ou 69 destas amostras, diluídas em 1:100, foram positivas para anticorpos contra *N. caninum*, sendo que, dentre estas, 50 não apresentavam anticorpos contra *T. gondii*. Por outro lado, pelo teste *immunoblotting*, que promove a migração eletroforética das proteínas, 1,6% ou 16 indivíduos foram fortemente reativos para antígenos de *N. caninum* (TRANAS et al., 1999).

No Brasil, foram realizados estudos analisando-se amostras de soros dos seguintes grupos de indivíduos: a.) mulheres que apresentavam ou não uma história freqüente de perda fetal; b.) indivíduos normais; e c.) pacientes infectados com o vírus HIV. Estudando-se 80 amostras de soros de cada grupo foi encontrado soropositividade de 5%, 3,8% e 15% respectivamente, das amostras analisadas utilizando-se o teste de imunofluorescência indireta (MAGALHÃES et al., 2002). No corrente ano, um novo trabalho foi realizado no Brasil, encontrando-se uma alta soropositividade de anticorpos IgG contra *N. caninum*, de 38% em pacientes HIV positivos, 18% em pacientes com desordens neurológicas, e 5 e 6% em recém-nascidos e indivíduos saudáveis, respectivamente (LOBATO et al., 2006).

Mediante estes achados, observa-se que os índices de soropositividade para *N. caninum* são maiores em pacientes imunodeprimidos.

1.10 – Imunodepressão na espécie humana

A integridade do sistema imune é essencial para a defesa do organismo contra agentes infecciosos, sendo de grande importância para a sobrevivência de todos os indivíduos. A falha de um ou mais componentes do sistema imune pode levar a desordens sérias ou até mesmo fatais. A presença de patógenos, neoplasias, terapias supressoras podem levar a alterações prejudiciais ao sistema imune de indivíduos.

Nas últimas décadas, o número de indivíduos imunocomprometidos tem aumentado na comunidade, devido à síndrome da imunodeficiência humana (SIDA/AIDS), transplantes, malignidades e novos tratamentos imunossupressores, tornando estes indivíduos mais vulneráveis às infecções secundárias.

Um dos agentes infecciosos causadores de doenças oportunistas mais frequentes em indivíduos imunocomprometidos é *Toxoplasma gondii*. Indivíduos positivos para *T. gondii*, que possuem um déficit no sistema imune, especialmente quando este leva a uma deficiência na imunidade celular, podem ter o risco de uma infecção crônica vir a se reativar e se disseminar, podendo levar a ocorrência de uma doença fulminante. Pacientes com neoplasias, com doença do colágeno, receptores de transplantes fazendo uso de terapia imunodepressiva e pacientes em hemodiálise com falha renal crônica apresentam deficiências na imunidade celular, sendo mais susceptíveis a infecção por *T. gondii* (YAZAR et al., 2003). Nestes pacientes, a infecção pode envolver o sistema nervoso central, causando encefalopatia difusa, meningoencefalites ou lesão na massa cerebral (FERREIRA & BORGES, 2002).

Imunodepressão em pacientes infectados pelo HIV

O vírus HIV é um dos patógenos que causa um estado de imunodepressão grave em seres humanos. Na fase aguda da infecção, o sistema imune tenta eliminar o vírus, porém neste período a perda de células T CD4⁺ é muito significativa. Neste estágio agudo da infecção, bilhões de vírions são produzidos diariamente no interior de células T CD4⁺. Aproximadamente 1-100 milhões de células T CD4⁺ morrem a cada dia em um processo dinâmico, em que cada célula infectada no estágio agudo da infecção gera aproximadamente 20 progênie infectadas durante sua vida. A fase aguda é caracterizada por uma alta viremia, queda brusca na contagem de células T CD4⁺ no sangue periférico, estabelecimento de um reservatório de células T CD4⁺ infectadas e o

desenvolvimento de uma resposta imune específica ao HIV (DOUEK, PICKER & KOUP, 2003). A exposição ao HIV está mais frequentemente ligada ao nível de mucosas, seja gastrointestinal ou gênito-urinária. Após o estabelecimento da infecção na mucosa, o HIV é rapidamente disseminado depois de aproximadamente 2 semanas, aumentando o número de células CD8⁺ em tecidos linfóides distantes, incluindo nódulos linfáticos, timo, baço e trato da mucosa. Uma das áreas de maior impacto da infecção aguda pelo HIV é o trato gastrointestinal, devido a presença e ampla distribuição de diferentes populações de células linfóides neste local. Estudos mostram que depois da infecção do vírus HIV em modelos murinos, os epitélios gastrointestinal e respiratório foram os maiores sítios seqüestradores de células CD4⁺ e CD8⁺. Em macacos infectados com SIV, intravenosamente ou via mucosa, tem-se uma rápida e profunda queda de células linfóides intestinais, tanto que estas são depletadas quase que inteiramente após três semanas de infecção (DOUEK, PICKER & KOUP, 2003). Após a fase aguda, ocorre a soroconversão no indivíduo e este entra numa fase latente. Neste momento, a replicação viral é parcial ocasionando uma queda nos níveis de viremia cair e um aumento nos níveis de células T CD4⁺, que não retornam, porém, aos níveis normais. Esta fase pode durar de 2 a 20 anos e a contagem de células T CD4⁺ é maior que 350 cels/mm³. Quando esta fase termina, começa a fase sintomática com a continuação da replicação viral que aumenta a viremia e faz os níveis de células T CD4⁺ caírem para valores entre 200-500 cels/mm³. Nesta fase, que dura em média de 2 a 3 anos, ocorre imunodepressão leve a moderada com o surgimento de algumas doenças oportunistas, afecções não-infecciosas ou neoplasias. Caso o paciente não tenha acesso ao tratamento, a progressão piora e há uma queda ainda maior de células T CD4⁺ para menos de 200 cels/mm³. Esta queda determina uma imunodepressão grave, com o conseqüente surgimento de infecções oportunistas graves que pode culminar com a morte do paciente (DOUEK, PICKER & KOUP, 2003).

Uma alta taxa de soropositividade para *N. caninum* vem sendo encontrada em pacientes portadores do HIV quando comparada a pacientes saudáveis (LOBATO et al., 2006). *N. caninum* pode persistir em seu hospedeiro por vários anos sem que este apresente sintomas clínicos, pois os parasitos permanecem latentes na maioria dos hospedeiros. Quando o indivíduo apresenta uma queda na resistência do sistema imune, estes parasitos podem reativar o seu ciclo replicativo, podendo levar a uma disseminação da infecção no hospedeiro. Por estes motivos, há a hipótese de que

pessoas imunocomprometidas tenham possibilidade de desenvolver uma doença recorrente da infecção pelo parasito.

Imunodepressão em pacientes transplantados

A imunodepressão em pacientes transplantados ocorre devido ao uso de drogas imunodepressoras utilizadas contra a rejeição do enxerto. Estas drogas podem ser agentes farmacológicos ou biológicos (MANFRO, NORONHA & SILVA FILHO, 2003).

Dentre os agentes farmacológicos os mais utilizados são: ciclosporina, micofenolato mofetil, tacrolimus, azatioprina e corticosteróides.

A ciclosporina é uma das drogas com atividade imunossupressora mais amplamente utilizada. Ela foi isolada de um fungo *Tolypocladium inflatum* na Noruega em 1970. Esta droga demonstrou, em camundongos, uma atividade imunodepressora sem causar depressão da medula óssea. A descoberta da ciclosporina representou um grande avanço na imunodepressão dos transplantes de órgãos. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição seletiva da transdução do sinal de ativação desencadeado pelo receptor de células T, ela age sobre os linfócitos T bloqueando a produção de IL-2, IL-1, IL-3, IL-4, IL-6 e IFN- γ .

O tacrolimus, droga isolada de um actinomiceto (*Streptomyces tsukubaensis*), em 1984, apresenta um mecanismo de ação muito semelhante a ciclosporina, apesar de apresentarem estruturas bastante diferentes. Esta droga bloqueia a ativação e a transcrição dos genes de citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN- γ e TNF- α), bloqueando a ativação linfocitária.

A azatioprina, um derivado imidazol, passou a ser utilizada com sucesso a partir de 1964 como imunodepressor, dando impulso à era dos transplantes. Ela age em linfócitos T e B, particularmente no processo de proliferação, porém não afeta a produção de citocinas.

O micofenolato mofetil não é uma droga nova, pois foi isolada de culturas de *Penicillium* em 1913, mas só foi reconhecida como droga imunodepressora em 1982. Esta droga é antiproliferativa e atua no processo de biossíntese de purinas possuindo certa seletividade em sua ação antiproliferativa celular. Em situações de ativação imunológica, o uso do ácido micofenólico resulta numa potente inibição da proliferação de linfócitos T e B, mas não inibe a ação de citocinas.

Os corticoesteróides são drogas com atividades imunodepressoras utilizadas desde 1960 e demonstraram serem importantes na prevenção de crises de rejeição aguda de órgãos transplantados. Os corticoesteróides foram incluídos nos esquemas de imunodepressão desde o início da era dos transplantes e até hoje continuam sendo a base da terapia imunodepressora. Os corticoesteróides inibem a ativação de linfócito T e de células apresentadoras de antígenos, a síntese de IL-1 por macrófagos e a síntese de IL-6, IL-2 e IFN- γ . Além disso, eles apresentam potente efeito anti-inflamatório, reduzindo a infiltração de macrófagos nos locais de inflamação.

Agentes biológicos também são utilizados como uma possível estratégia específica e seletiva de imunodepressão, apresentando como alvos distintas moléculas de superfície dos linfócitos. Dentre estes, tem-se diversos anticorpos dirigidos contra sítios específicos da resposta imune.

Novas drogas têm sido fabricadas e utilizadas na terapia imunodepressora afim de melhorar sua eficácia e reduzindo os efeitos colaterais gastrointestinais. Dentre elas estão: a rapamicina, sirolimus, everolimus, micofenolato de sódio (MPS) e FTY720A. Estas drogas agem inibindo componentes do sistema imune (MANFRO, NORONHA & SILVA FILHO, 2003)

O uso destes medicamentos em associação, como geralmente é utilizado, leva o paciente a um estado de imunodepressão, o que os deixa mais susceptíveis a infecções oportunistas (MANFRO, NORONHA & SILVA FILHO, 2003)

Em um estudo realizado na França, foi observado que a toxoplasmose ocorreu em 1.5% de receptores de transplante renal e nestes pacientes os sítios de infecção mais afetados foram o cérebro, coração e pulmão. Geralmente esta toxoplasmose pode ser severa, sendo que na maioria dos casos chega a ser letal ao paciente (RENOULT, GEORGES & BIAVA, 1997).

Imunodepressão em paciente com neoplasias

As funções do sistema imune estão alteradas em pacientes com neoplasias, isto ocorre devido ao tratamento de uma terapia anti-neoplásica e à própria imunodepressão induzida pelo sistema imune em pacientes oncológicos.

Na terapia antineoplásica, os quimioterápicos utilizados não atuam exclusivamente sobre as células tumorais. As estruturas normais que se renovam constantemente, como a medula óssea, anexos da pele e a mucosa do tubo digestivo, são também atingidas pela

ação destes medicamentos. Vários são os sintomas e efeitos causados pela utilização destes quimioterápicos, sendo que um deles é a imunodepressão.

Por estas razões, pacientes com neoplasias também podem estar mais susceptíveis a infecções por patógenos. Frequentemente, a presença de tumores sólidos no pulmão, ovário ou mama têm sido associada à toxoplasmose, em pacientes tratados com agentes anti-neoplásicos,. O mecanismo no qual estes tumores predispõem ao desenvolvimento da toxoplasmose ainda não é bem caracterizado, mas acredita-se que estas duas patologias estão associadas com defeitos na imunidade mediada por células. Existem vários relatos na literatura demonstrando a associação entre *T. gondii* e neoplasias, como casos de mielites por *T. gondii* em um paciente com leucemia de células T (MACIEL et al., 2000); mulheres com neoplasias ginecológicas (HUANG et al., 2000); em pacientes com adenoma de pituitária (ZHANG et al., 2002) e em pacientes com leucemia que realizaram transplantes de medula óssea (WEINRACH et al., 2001).

Imunodepressão em pacientes com falha renal crônica em processo de hemodiálise

A resposta imune celular e humoral estão comprometidas em indivíduos urêmicos (WILSON et al., 1965), e as funções celulares são prejudicadas (DOBBELSTEIN, HORNER, & MEMPEL, 1974). Além disto, tem sido também reportado que o número absoluto de células T circulantes está reduzido, que o número de células supressoras está aumentado e que a hemodiálise não restaura o prejuízo do status imune em pacientes com falha renal crônica. A depressão na imunidade mediada por células nestes indivíduos tem sido atribuída à deficiência de vitamina B₆, à terapia antimicrobiana e à ativação de mecanismos supressores. Estes eventos provavelmente contribuem para um quadro imunodepressão e uma alta incidência de infecção em pacientes em processo de hemodiálise (HANICHI, CICHOCKI e SARNECKA-KELLER, 1976).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em indivíduos imunodeprimidos, pertencentes aos seguintes grupos: pacientes portadores de HIV, pacientes transplantados, pacientes portadores de neoplasias, pacientes submetidos ao processo de hemodiálise.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* por ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunofluorescência indireta (IFAT) e *Western blot* (WB) em amostras de soros de pacientes imunodeprimidos.
- Avaliar a soropositividade a *N. caninum* em pacientes imunodeprimidos em relação à soropositividade a *T. gondii*.
- Identificar os antígenos imunodominantes de *N. caninum* por *Western blot* reconhecidos por amostras de soros dos pacientes imunodeprimidos.
- Analisar a soropositividade a *N. caninum* em relação às características clínicas e laboratoriais dos pacientes imunodeprimidos.

3.0 Material e Métodos

3.1 Pacientes e amostras de soro

Um total de 331 amostras de soros foi analisado e distribuído em quatro grupos de pacientes:

- ⇒ (I) 65 pacientes HIV positivos selecionados no Laboratório de Sorologia do Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU), com o teste ELISA (AxSYM® HIV 1/2 gO, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) positivo e tiveram este teste confirmado com resultado positivo no teste de imunocromatografia (Determine™ HIV 1/2, Abbott) no período de maio de 2004 a 3 de novembro de 2004. Estes pacientes tinham um intervalo de idade de 15-65 anos (média: 36 ± 11).
- ⇒ (II) 62 pacientes transplantados, selecionados no Ambulatório de Nefrologia do (HC-UFU) que foram submetidos a transplante de órgão (fígado, rim ou córnea) e fazem o uso de medicamentos imunodepressores no período de agosto de 2004 a março de 2005. Estes pacientes tinham um intervalo de idade de 16-81 anos (média: 43 ± 15).
- ⇒ (III) 87 pacientes oncológicos, todos eles com diagnóstico de câncer e que se encontravam em diversas fases de tratamento fazendo acompanhamento médico no Hospital de Câncer de Uberlândia, no período de novembro de 2004 a abril de 2005. Estes pacientes tinham um intervalo de idade de 7-88 anos (média: 56 ± 19).
- ⇒ (IV) 53 pacientes em hemodiálise no HC-UFU, pacientes renais crônicos que realizavam três sessões de hemodiálise por semana, no período de março de 2005. Estes pacientes tinham um intervalo de idade de 12-78 anos (média: 44 ± 18).
- ⇒ (V) 64 doadores de sangue, selecionados no Hemocentro Regional de Uberlândia/MG que passaram por uma triagem médica e sorológica, no período de novembro de 2005. Estes pacientes tinham um intervalo de idade de 18-47 anos (média: 29 ± 8).

3.2 Submissão do projeto ao Comitê de Ética

Este projeto foi submetido ao Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia protocolado e aprovado sob o número 009/2003 (Anexo 1). Os pacientes que fizeram parte deste trabalho assinaram um termo de consentimento concordando em participar deste trabalho (Anexo 2).

3.3 Parasitos

3.3.1 *Neospora caninum* – Os parasitos foram obtidos a partir de cultura de células de uma linhagem de monócitos bovinos (M617) como descrito por Speer e colaboradores (1985). Os monócitos bovinos foram cultivados em garrafas plásticas de cultura celular (25 e 75 cm²; Costar, USA) até atingirem a confluência. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 suplementado com HEPES 25 mM, penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100µg/ml), L-Glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e soro fetal bovino (SFB) a 10%. As células hospedeiras foram cultivadas e infectadas com taquizoítas de *N. caninum* da cepa Nc-1 (DUBEY et al., 1988) na proporção de 3 x 10⁵ parasitos por garrafa de 25 cm² de cultura de células M617, os parasitos foram mantidos por passagem seriada em meio RPMI 1640 contendo soro fetal bovino (SFB) a 3%, a cada 48 a 72 horas. O repique consistiu da utilização de *cell scraper* por toda a superfície interior da garrafa de cultura e o sobrenadante foi centrifugado a 720 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de meio de cultura RPMI 1640 incompleto sem a adição de SFB e serviu como inóculo para infecção de novas garrafas de células M617.

3.3.2 *Toxoplasma gondii* – Taquizoítas da cepa RH foram obtidos seguindo protocolo previamente descrito por Mineo e colaboradores (1980). Em resumo, os parasitos foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos alogênicos da linhagem Swiss-Webster, através de passagens seriadas a intervalos de 48 a 72 horas de um inóculo de aproximadamente 10⁶ taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados. O exsudato peritoneal foi obtido por lavagem da cavidade abdominal com solução salina tamponada com fosfatos a

0,01M (PBS) pH 7,2 estéril e, após exame sob microscopia óptica, foram selecionados os exsudatos com maior quantidade de taquizoítas livres e menor contaminação com células e/ou hemácias.

3.4 Antígenos de *N. caninum* e *Toxoplasma gondii*

3.4.1 Antígenos solúveis – Antígenos solúveis de *N. caninum* e *T. gondii* a serem utilizados nas reações imunoenzimáticas (ELISA) foram preparados segundo o método descrito por Scott e colaboradores (1987), com algumas modificações. Taquizoítas dos parasitos foram obtidos como anteriormente descrito e centrifugados a 720 x g por 10 minutos a 4 °C em PBS estéril. As suspensões parasitárias foram lavadas mais duas vezes em PBS, por centrifugação a 720 x g a 4 °C por 10 minutos. A concentração de parasitos foi ajustada para 1×10^9 taquizoítas em 2 mL de PBS contendo inibidores de proteases (PMSF a 1,6 mM, benzamidina a 1 µM e aprotinina a 100 µg/mL) e incubado por 10 minutos em banho de gelo. A seguir, foram realizados 10 ciclos de congelamento e descongelamento em N₂ líquido e banho-maria a 37 °C, respectivamente. O extrato antigênico obtido foi clarificado por centrifugação a 5.000 x g a 4 °C por 30 minutos e o sobrenadante (antígeno solúvel) foi coletado, sua concentração protéica determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951) e estocado a – 20 °C até o momento do uso.

3.4.2 Antígenos íntegros – Antígenos íntegros de *N. caninum* e *T. gondii* a serem utilizados nas reações de imunofluorescência indireta (IFAT) foram preparados segundo o método descrito por Camargo (1964). Taquizoítas dos parasitos foram obtidos como anteriormente descrito, lavados em PBS estéril e a concentração de parasitos foi ajustada para 1×10^7 taquizoítas em 10 ml de PBS contendo 1% de formaldeído. A suspensão parasitária foi mantida sob agitação constante durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 720 x g por 10 minutos a 4°C e o sedimento resultante foi lavado em PBS por mais dois ciclos de centrifugação. Após a última lavagem, os taquizoítas foram ressuspensos em água destilada estéril e a concentração de parasitos ajustada para 20 parasitos por campo microscópico, em uma magnitude de 400X. Um volume de 10 µl da suspensão parasitária foi adicionado em áreas demarcadas de lâminas microscópicas para

imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda, São Paulo, SP, Brasil) previamente lavadas e desgorduradas, incubando-se por 3 a 4 horas à temperatura ambiente. As lâminas contendo taquizoítas de parasitos formolizados foram individualmente acondicionadas em lenços de papel e papel alumínio, sendo posteriormente armazenadas em embalagens plásticas a – 20 °C.

3.5 Testes sorológicos

3.5.1– ELISA – Para detectar anticorpos IgG anti *N. caninum* (Nc) e *T. gondii*(Tg) foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA-Nc e ELISA-Tg), de acordo com Mineo e colaboradores (1980), com algumas modificações. As concentrações ótimas de cada reagente bem como as condições ideais de tempo e temperatura da reação foram determinadas através da titulação em bloco dos reagentes (antígeno, soros controles e conjugados). Soros controles IgG positivos para *T. gondii* e *N. caninum* foram obtidos de três pacientes cronicamente infectados com sorologia previamente determinada por testes sorológicos convencionais. Soros controles negativos foram obtidos de indivíduos com resultados sorológicos comprovadamente negativos para *T. gondii* e *N. caninum*.

Em resumo, placas de microtitulação de poliestireno (Montegrotto, Palermo, Itália) foram sensibilizadas com antígeno solúvel de cada parasito, na concentração de 20 µg/ml (ELISA-Nc) e 10 µg/ml (ELISA-Tg) em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS adicionado de 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As amostras de soros foram adicionadas, em duplicata, na diluição de 1:100 (ELISA-Nc) e 1:64 (ELISA-Tg) em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) (PBS-TM). Após incubação de 60 minutos a 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T. Em seguida, foi adicionado o conjugado imunoenzimático anti-IgG humana-peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) na diluição 1: 1000 (ELISA-Nc) e de 1:2000 (ELISA-Tg) em PBS-TM, com incubação de 60 minutos a 37°C. Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, foi adicionado o substrato enzimático consistindo de H₂O₂ a 0,012% em tampão cromógeno (orto-fenilenediamina – OPD - a 0,5 mg/ml em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N. As densidades ópticas (DO) obtidas

foram determinadas em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus; Flow Laboratories, Genebra, Suíça) a um comprimento de onda de 492 nm. Três soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O *cut off* (limite de positividade) foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescido de cinco desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos arbitrariamente em Índices ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO_{amostra} / DO_{cut\ off}$ como previamente descrito por Silva e colaboradores (2002). Valores de $IE \geq 1.1$ foram considerados como resultado positivo.

3.5.2 – IFAT – A técnica de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* (IFAT-Nc) e anti-*T. gondii* (IFAT-Tg) foi realizada de acordo com Mineo e colaboradores (2001) e Camargo (1964), respectivamente. Lâminas com taquizoítas de *N. caninum* ou *T. gondii* formolizados foram incubadas com as amostras de soro diluídas a 1:100 (IFAT-Nc) ou 1:64 (IFAT-Tg) em PBS contendo 1% de soroalbumina bovina (BSA). As lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida e, em seguida, foram submetidas a três ciclos de lavagens em tampão carbonato pH 9,0 durante cinco minutos cada. A próxima etapa consistiu da adição do conjugado anti-IgG humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Chemical Co.) diluído a 1:80 em azul de Evans a 0,01% em PBS para ambos parasitos. Após incubação de 30 minutos a 37°C, as lâminas foram novamente lavadas, montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 9,0) e examinadas em microscópio epifluorescente (Olympus Mod. BH2, Tokyo, Japão). As reações que apresentaram completa fluorescência periférica, brilhante e uniforme dos parasitos foram consideradas positivas. Qualquer coloração polar ou apical foi considerada como resultado negativo para ambos parasitos.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os antígenos solúveis de *N. caninum* foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em condições desnaturantes e não-redutoras (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970), utilizando o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Mighty Small.). Amostras de antígenos solúveis de *N. caninum* (Nc-criólise)

foram misturadas (v/v) em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%). Em paralelo, o sedimento dos antígenos solúveis obtidos foram ressuspensos em 0,5 ml de PBS e solubilizados em tampão de amostra (v/v), assim gerando o antígeno Nc-SDS. Ambos antígenos foram submetidos a um aquecimento de 100°C durante 5 minutos e, a seguir, volumes de 15 µl foram aplicados por poço e submetidos a uma corrente de 20 mA por 1 hora. Em paralelo, padrões de pesos moleculares (Sigma) foram incluídos em cada corrida eletroforética. Após a separação eletroforética dos componentes protéicos, o gel foi submetido à coloração com nitrato de prata, segundo o método de Blum e colaboradores (1987) para a identificação das frações protéicas de *N. caninum*. A massa molecular aparente das bandas antigênicas foi determinada por densitometria pelo sistema EDAS 290 (Eastman Kodak, Rochester, USA)

3.7 Western blot (WB)

Após a separação eletroforética, as frações protéicas do antígeno Nc-SDS foram transferidas para membranas de nitrocelulose com poros de 0,22 µm (Sigma) de acordo com o método de Towbin e colaboradores (1979), utilizando um sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Suécia) por 2 horas a uma corrente de 0,8 mA por cm² de gel. As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm de largura e colocadas em canaletas apropriadas para a reação. A seguir, as tiras foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) por 2 horas à temperatura ambiente, para bloquear os sítios ativos ligantes de proteínas. Subseqüentemente, as tiras foram incubadas por 18 horas a 4°C com amostras de soros (500 µL por canaleta) na diluição de 1:100 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado (PBS-TM). Amostras de soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada análise. Após seis lavagens de 5 minutos com PBS-T, as tiras foram incubadas com o conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase (Sigma) na diluição ótima de 1:1000 em PBS-TM. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente e novo ciclo de lavagens como anteriormente descrito, as tiras foram reveladas pela adição do substrato enzimático [10 mg de 3,3'-tetrahydrocloro de diaminobenzidina (DAB)

em 10 mL de PBs com 1% de H₂O₂]. A reação foi interrompida por lavagens em água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas. A reatividade a pelo menos dois de três antígenos imunodominantes de *N. caninum* (p17, p29 e/ou p35) foi considerada como um teste positivo em WB.

3.8 Análise de questionário e prontuários

Todos os pacientes responderam a um questionário (Anexo 3), e os dados clínicos e laboratoriais julgados mais relevantes foram analisados diretamente nos prontuários destes pacientes.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística consistiu na utilização de programas computadorizados específicos (*GraphPad Prism* versão 3.0 – *GraphPad Software, Inc.*; *Statistic for Windows* – versão 4.5 A - *Statesoft, Inc.* 1993) para cálculos de frequência, média, desvio padrão, correlações, associações ou outras análises que se fizerem necessárias. A comparação entre as percentagens de soropositividade encontradas para os diferentes grupos foi realizada por meio da análise entre duas proporções por estatística Z. Todos os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3.10 Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos técnicos foram realizados seguindo as normas de biossegurança (CHAVES-BORGES & MINEO, 1997).

4.0 RESULTADOS

Um total de 331 amostras de soros foi analisado em cinco grupos de pacientes: HIV-positivos (n=65), transplantados (n=62), oncológicos (n=87), em hemodiálise (n=53) e doadores de sangue (n=64).

Todas as amostras foram inicialmente testadas para anticorpos IgG anti- *T. gondii* por ELISA e IFAT, sendo que amostra com teste discordante eram confirmadas no teste de WB. Estas amostras foram distribuídas em dois sub-grupos: soropositivos (Tg+) e soronegativos (Tg-) a *T. gondii*. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 41 (63%) dos 65 pacientes HIV positivos, 45 (73%) dos 62 pacientes transplantados, 63 (72%) dos 87 pacientes oncológicos, 35 (66%) dos 53 pacientes em hemodiálise e 35 (55%) dos 64 doadores de sangue (Figura 3). A soropositividade foi significativamente maior em pacientes transplantados ($P=0.0375$), pacientes oncológicos ($P=0.0323$) e pacientes em hemodiálise ($P=0.02292$) em relação ao grupo de doadores de sangue.

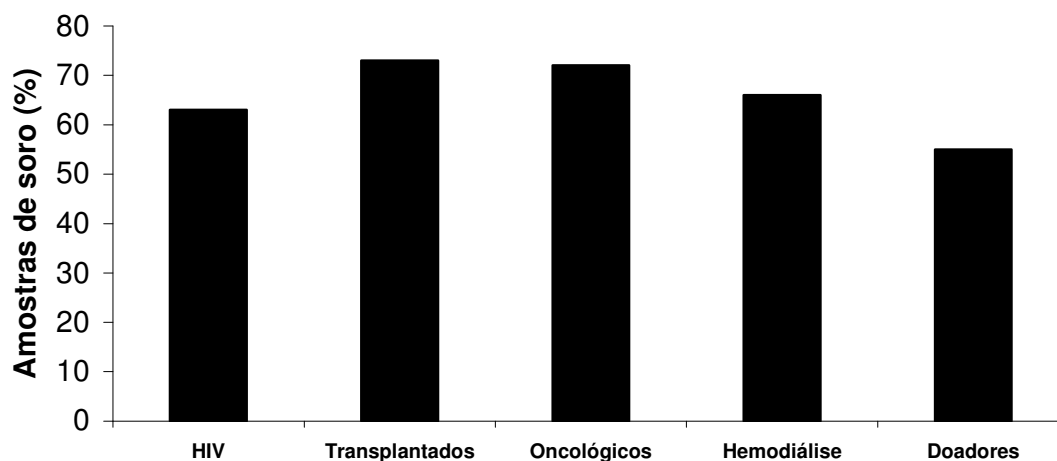


Figura 2. Resultados da sorologia por ELISA, IFAT e WB para anticorpos IgG anti- *T. gondii* entre os cinco grupos analisados: pacientes portadores do HIV (n=65), transplantados (n=62), oncológicos (n=87), hemodiálise (n=53) e doadores de sangue (n=64).

Todas as amostras de soros foram então analisadas para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* por ELISA e IFAT, sendo que os resultados discordantes entre os dois testes sorológicos foram reavaliados por WB.

De acordo com os resultados concordantes e discordantes nos dois testes (ELISA e IFAT) e naqueles discordantes que resultaram positivos no WB, a presença de anticorpos anti-*N. caninum* foi detectada em 18 (28%) dos 65 pacientes HIV positivos (Tabela 1), sendo 17 (27%) soropositivos concomitantemente a *T. gondii* (Tg+) e apenas 1 (1) mostrando positividade somente a *N. caninum* (Tg -soronegativos). Infecção concomitante entre *N. caninum* e *T. gondii* foi significativamente maior que a infecção única para *N. caninum* ($P=0.009$).

Tabela 1. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detectar anticorpos IgG anti-*N. caninum* em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em relação à sorologia para *Toxoplasma gondii*.

Grupos	Nº de amostras (%)	Resultados Sorológicos para <i>N. caninum</i> (%)				Western Blot ^a	Total ^b
		ELISA/ÍFAT concordantes		ELISA/IFAT discordantes			
		+/+	-/-	+/-	-/+		
Tg +	41 (63)	14 (22)	12 (18)	15 (23)	0 (0)	3 (5)	17 (27)*
Tg -	24 (37)	1 (1)	16 (25)	7 (11)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
Total	65 (100)	15 (23)	28 (43)	22 (34)	0 (0)	3 (5)	18 (28)

Tg+: soropositivos para *T. gondii*; Tg-: soronegativos para *T. gondii*;

^a: Resultados discordantes que foram confirmados como positivos por *Western blot* (WB).

^b: Total de soropositivos, sendo a soma de concordantes positivos mais resultados confirmados no WB.

*: Resultado estatisticamente significativo ($P<0.05$).

No grupo de transplantados (Tabela 2), anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em 4 (7%) dos pacientes, sendo que 3 (5%) apresentou soropositividade concomitante para *N. caninum* e *T. gondii* e somente 1 (2%) apresentou soropositividade somente para *N. caninum*. Não houve diferença significativa entre os grupos *T. gondii* positivos e negativos.

Tabela 2. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em pacientes transplantados em relação à sorologia para *Toxoplasma gondii*.

Grupos	Nº de amostras (%)	Resultados Sorológicos para <i>N. caninum</i> (%)				Westen Blot ^a	Total ^b
		ELISA/ÍFAT concordantes		ELISA/IFAT discordantes			
		+/+	-/-	+/-	-/+		
Tg +	45 (73)	2 (3)	34 (55)	5 (8)	4 (6)	1 (2)	3 (5)
Tg -	17 (27)	1(2)	12 (19)	2 (3)	2 (3)	0 (0)	1 (2)
Total	62 (100)	3 (5)	46 (74)	7 (11)	6 (9)	1 (2)	4 (7)

Tg+: soropositivos para *T. gondii*; Tg-: soronegativos para *T. gondii*;

^a: Resultados discordantes que foram confirmados como positivos por *Western blot* (WB).

^b: Total de soropositivos, sendo a soma de concordantes positivos mais resultados confirmados no WB.

As amostras de sangue dos grupos de pacientes oncológicos (Tabela 3) foram analisadas e a presença de anticorpos anti-*N. caninum* foi detectada em 12 (13%) dos pacientes, 11 (12%) *T. gondii* positivos e somente 1 (1%) *T. gondii* negativos, não havendo diferença significativa em relação á sorologia para *T. gondii* ($P > 0.05$).

Tabela 3. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em pacientes oncológicos em relação à sorologia para *Toxoplasma gondii*.

Grupos	Nº de amostras (%)	Resultados Sorologicos para <i>N. caninum</i> (%)				Westen Blot ^a	Total ^b
		ELISA/ÍFAT concordantes		ELISA/IFAT discordantes			
		+/+	-/-	+/-	-/+		
Tg +	63 (72)	9 (10)	41 (47)	12 (14)	1 (1)	2 (2)	11 (12)
Tg -	24 (28)	1 (1)	20 (23)	3 (3)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
Total	87 (100)	10 (11)	61 (70)	15 (17)	1 (1)	2 (2)	12 (13)

Tg+: soropositivos para *T. gondii*; Tg-: soronegativos para *T. gondii*;

^a: Resultados discordantes que foram confirmados como positivos por *Western blot* (WB).

^b: Total de soropositivos, sendo a soma de concordantes positivos mais resultados confirmados no WB.

O grupo de pacientes em hemodiálise (Tabela 4) revelou 6 (11%) de suas amostras positivas para *N. caninum*, sendo todas elas positivas concomitantemente a *T. gondii*, não apresentando diferença significativa entre soropositivos e soronegativos a *T. gondii* ($P > 0.05$).

Tabela 4. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em pacientes em hemodiálise em relação à sorologia para *Toxoplasma gondii*.

Grupos	Nº de amostras (%)	Resultados Sorológicos para <i>N. caninum</i> (%)				Westen Blot ^a	Total ^b
		ELISA/ÍFAT concordantes		ELISA/ÍFAT discordantes			
		+/+	-/-	+/-	-/+		
Tg +	35 (66)	1 (2)	24 (45)	9 (17)	1 (2)	5 (9)	6 (11)
Tg -	18 (34)	0(0)	17 (32)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	53 (100)	1 (2)	41 (77)	10 (19)	1 (2)	5 (9)	6 (11)

Tg+: soropositivos para *T. gondii*; Tg-: soronegativos para *T. gondii*;

^a: Resultados discordantes que foram confirmados como positivos por *Western blot* (WB).

^b: Total de soropositivos, sendo a soma de concordantes positivos mais resultados confirmados no WB.

O grupo de doadores de sangue foi utilizado como um grupo controle por conter pacientes saudáveis. Neste grupo (Tabela 5) foram encontrados anticorpos anti-*N. caninum* em 3 (5%) de 64 amostras analisadas, sendo 2 (3%) *T. gondii* positivas e 1 (2%) *T. gondii* negativas. Não houve diferença significativa entre positivos e negativos para sorologia de *T. gondii*.

Anticorpos IgG foram predominantemente detectados em pacientes HIV positivos (28%) quando comparado com transplantados ($P=0.0024$), oncológicos ($P=0.00221$), hemodiálise ($P=0.00244$) e em doadores de sangue ($P=0.006$). Os outros três grupos de pacientes imunodeprimidos (transplantados, oncológicos e hemodiálise) não mostraram diferença significativa de sua soropositividade a *N. caninum* quando comparados entre eles ou com o grupo de doadores de sangue.

Tabela 5. Resultados sorológicos obtidos por ELISA, IFAT e WB para detectar anticorpos IgG anti-*N. caninum* em doadores de sangue em relação à sorologia para *Toxoplasma gondii*.

Grupos	Nº de amostras (%)	Resultados Sorologicos para <i>N. caninum</i> (%)				Western Blot ^a	Total ^b
		ELISA/ÍFAT concordantes		ELISA/IFAT discordantes			
		+/+	-/-	+/-	-/+		
Tg +	35 (55)	2 (3)	24 (37)	5 (8)	4 (6)	0 (0)	2 (3)
Tg -	29 (45)	1(2)	24 (37)	2 (3)	2 (3)	0 (0)	1 (2)
Total	64 (100)	3 (5)	48 (74)	6 (9)	7 (11)	0 (0)	3 (5)

Tg+: soropositivos para *T. gondii*; Tg-: soronegativos para *T. gondii*;

^a: Resultados discordantes que foram confirmados como positivos por *Western blot* (WB).

^b: Total de soropositivos, sendo a soma de concordantes positivos mais resultados confirmados no WB.

A soropositividade global para *N. caninum* entre os grupos de pacientes soropositivos (Tg+) e soronegativos (Tg-) para *T. gondii* está demonstrada na Figura 3.

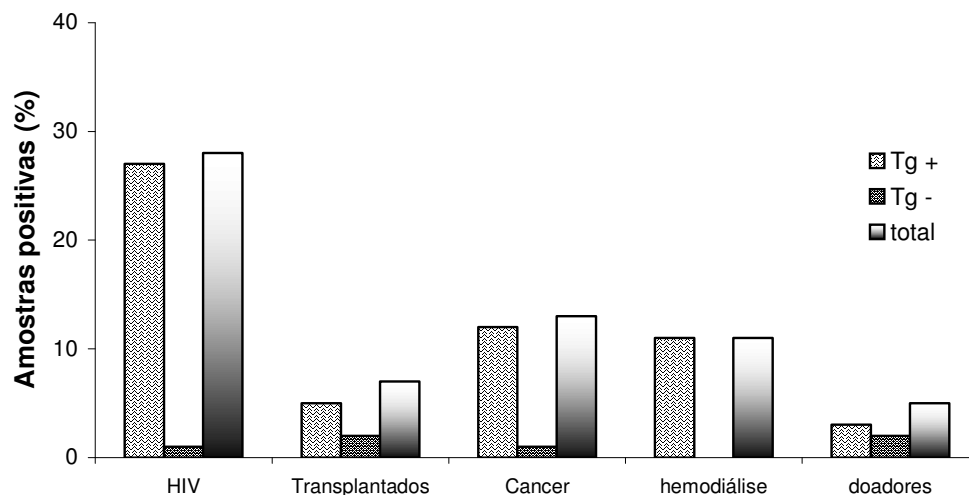


Figura 3. Soropositividade global para anticorpos anti-*N. caninum* em pacientes portadores do HIV (n=65), transplantados (n=62), oncológicos (n=87), hemodiálise (n=53) e doadores de sangue (n=64) soropositivos (Tg+) e soronegativos (Tg-) para *T. gondii*. Os dados representam resultados concordantes (ELISA e IFAT) juntamente com resultados discordantes que foram confirmados por WB, considerando a reatividade a pelo menos dois componentes antigênicos imunodominantes (p17, p29 e p35) de *N. caninum* como resultado positivo em WB.

O perfil eletroforético dos antígenos de *N. caninum* em SDS-PAGE corado por nitrato de prata, observando uma ampla faixa de proteínas variando de 10-97 kDa foram visualizadas para diferentes antígenos (Nc-criólise ou Nc-SDS). Após a transferência eletroforética das proteínas do antígeno Nc-SDS para membranas de nitrocelulose, a reação de WB (Figura 4) com soros positivos e negativos permitiu identificar várias proteínas, sendo adquirido como caráter de positividade os soros que reagem com pelo menos dois de três antígenos imunodominantes do parasito (proteínas de 17, 29 e 35 kDa).

A sororeatividade a *N. caninum* foi confirmada por WB-Nc testando todos os soros dos diferentes grupos de pacientes que tiveram resultados concordantes e discordantes nos teste ELISA e IFAT para anticorpos IgG anti-*N. caninum*. Observou-se que as banda que marcam as proteínas de menor peso molecular (17, 29, e 35 kDa)

estavam presentes em soros que tinham testes concordantes positivos (ELISA+/IFAT+) e que bandas de maior peso molecular (43, 57, 61, 78 e 87 kDa) estavam presentes com maior frequência em soros com resultados discordantes e concordantes negativos (Figura 5). É interessante a banda de 35 kDa é frequente em vários soros sejam eles concordantes positivos e negativos ou discordantes.

Para investigar possíveis infecções concomitantes com *N. caninum* e *T. gondii* e para confirmar a especificidade de *N. caninum*, todos os soros foram testados em paralelo para a sorologia de ELISA-Tg e IFAT-Tg, e os resultados discordantes foram confirmados por WB-Tg, sendo considerados positivos os soros que eram reativos com a SAG1 (p30), antígeno imunodominante de *T. gondii* que é marcador de positividade para este parasito (Tabela 6). De 65 amostras de pacientes portadores do vírus HIV 25 (38%) foram positivos somente para *T. gondii*, enquanto somente 1 (1%) soro foi positivo somente para *N. caninum* e 17 (27%) foram positivos tanto para *T. gondii* como para *N. caninum*. A soropositividade de *N. caninum* foi significativamente associada com a soropositividade para *T. gondii* neste grupo ($P<0.0001$). No grupo dos transplantados o mesmo não ocorreu, pois de 62 pacientes 42 (68%) eram positivos somente para *T. gondii*, 1 (2%) foi positivo somente para *N. caninum* e 3 (5%) positivos para ambos parasitos, não houve uma associação significativa entre pacientes deste grupo ($P=0.7220$). No grupo de pacientes oncológicos, de 87 indivíduos 52 (60%) foram positivos somente para *T. gondii*, somente 1 (1%) era positivo somente para *N. caninum* e 11 (12%) dos pacientes eram positivos para ambos parasitos. No grupo de 53 pacientes em hemodiálise, 29 eram positivos somente para *T. gondii*, nenhum paciente apresentou positividade somente para *N. caninum* e 6 (11%) eram positivos para os dois parasitos. Nestes dois últimos grupos de pacientes oncológicos e em hemodiálise houve uma associação entre a positividade de *N. caninum* e *T. gondii*, tendo o grupo de pacientes oncológicos $P=0.0037$ e o grupo de pacientes em hemodiálise $P=0.0145$. No grupo de 64 doadores de sangue 33 (51%) deles apresentaram positividade somente para *T. gondii*, 1 (2%) apresentou positividade somente para *N. caninum* e 2 (3%) apresentaram positividade para ambos parasitos. Não houve associação entre a positividade de *T. gondii* e *N. caninum*. Portanto observou-se que há uma associação entre a positividade destes dois parasitos principalmente no grupo de pacientes portadores do vírus HIV, mas também em pacientes oncológicos e em hemodiálise.

A Figura 4 ilustra representativamente os resultados de ensaios de WB de soros humanos positivos e negativos contra *N. caninum* nos diferentes grupos de pacientes,

mostrando que soros positivos apresentam marcação de bandas de alto e baixo peso molecular, notando a presença das bandas imunodominantes do *N. caninum*. E interessante os soros negativos possuem uma marcação, principalmente da banda de 35 kDa e de proteínas de alto peso molecular (43, 57, 61, 78 e 87). Não foi observada uma ligação significativa entre a presença destas bandas de alto peso molecular com a soropositividade a *T. gondii*.

Tabela 6. Soropositividade a *Toxoplasma gondii* e *N. caninum* por ELISA, IFAT e WB em diferentes grupos de pacientes.

Grupos de pacientes	Número de amostras de soros	Soropositividade		
		Somente a <i>T. gondii</i>	Somente a <i>N. caninum</i>	Ambos parasitos
		(Tg+/Nc-)	(Tg-/Nc+)	(Tg+/Nc+)
HIV	65	25 (38%)	1 (1%)	17 (27%)**
Tansplantados	62	42 (68%)	1 (2%)	3 (5%)
Oncológicos	87	52 (60%)	1 (1%)	11 (12%)*
Hemodiálise	53	29 (55%)	0 (0%)	6 (11%)*
Doadores de sangue	64	33 (51%)	1 (2%)	2 (3%)
Total	331	181 (55%)	4 (1%)	39 (12%)

* $P < 0.05$ e ** $P < 0.0001$ comparando soropositividade de ambos parasitos e somente para *N. caninum*.

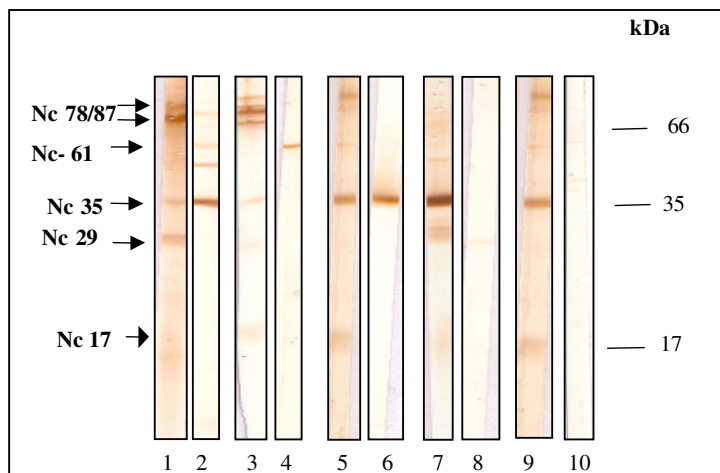


Figura 4. Western blot (WB) de antígenos de *N. caninum* testados em soros positivos e negativos nos diferentes grupos de pacientes: (1 e 2) HIV positivos, (3 e 4) transplantados, (5 e 6) oncológicos, (7 e 8) em processo de hemodiálise e (9 e 10) doadores de sangue. As tiras (1, 3, 5, 7 e 9) representam soros positivos e as tiras (2, 4, 6, 8 e 10) representam soros negativos ao *N. caninum*.

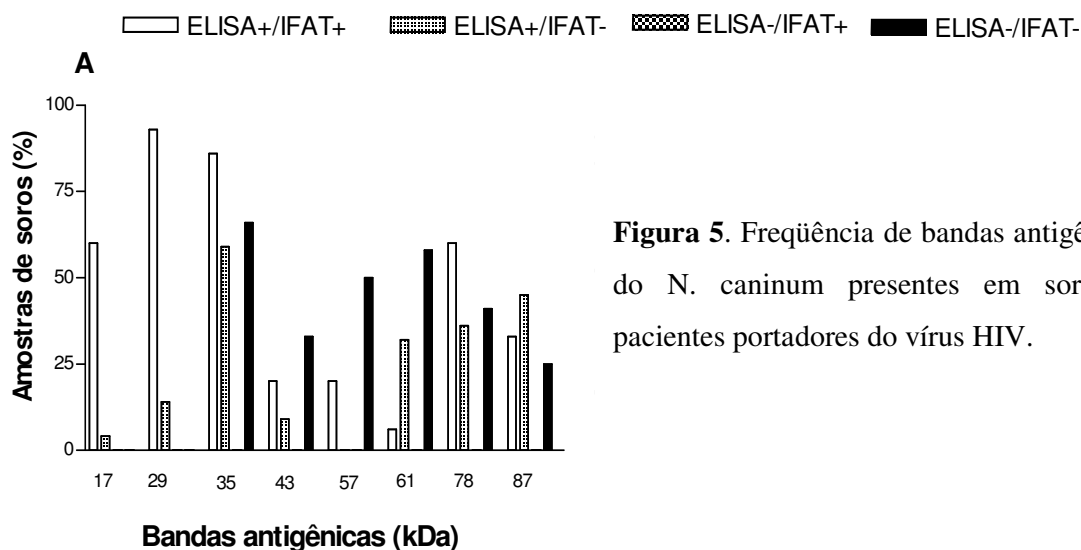


Figura 5. Frequência de bandas antigênicas do *N. caninum* presentes em soro de pacientes portadores do vírus HIV.

Como foi observado que ocorre uma forte associação entre a soropositividade de *T. gondii* e *N. caninum*, foi investigado se também poderia ocorrer associações semelhantes de pacientes portadores do vírus HIV positivos para *N. caninum* e a soropositividade a outros patógenos. Como pode ser na Tabela 7, não houve associação significativa com os outros patógenos selecionados.

Tabela 7. Resultados das soropositividades para diversos patógenos em pacientes portadores do vírus HIV soropositivos para *N. caninum*.

	A3	A5	A13	A19	A23	A30	A31	A39	A45	A47	A50	A54	A56	A57	A60	A61	A62	A63	Total
<i>T. Cruzi</i>			x												x				2 (11%)
CMV		x	x	x						x									4(22%)
HCV										x									1 (5%)
HBV	x		x				x						x		x				4(22%)
<i>T. gondii</i>		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	17(94%)
Rubéola			x																1(5%)
VRDL		x								x					x				3(16%)

CMV: Citomegalovírus; HCV: Vírus da hepatite C; HBV: Vírus da hepatite B; VRDL: *Veneral Research Disease Laboratory*

O grupo de pacientes portador do vírus HIV apresentou algumas características em comum quanto ao tempo do primeiro teste sorológico positivo para o vírus HIV. As amostras de soros utilizadas neste trabalho foram as mesmas utilizadas para a realização da terceira amostra solicitada para o teste HIV. Não se sabe ao certo qual o tempo de infecção destes pacientes com o vírus, mas podemos observar que o grupo é formado por muitos indivíduos que estão em início de tratamento, que podem ter passado pela fase aguda recentemente. Neste grupo algumas amostras de soros foram provenientes

de crianças recém-nascidas de mães HIV positivas e apresentaram testes sorológicos positivos para anticorpos IgG contra *N. caninum*, refletindo a soropositividade materna.

Quando analisadas as idades de todos os pacientes, notou-se que o grupo I e V são grupos mais jovens que os grupos II, III e IV.

5.0 DISCUSSÃO

Devido às similaridades entre *N. caninum* e *T. gondii*, adicionado ao importante papel dos cães como hospedeiros definitivos do *N. caninum* e como animais de companhia para a espécie humana, o potencial de exposição do *N. caninum* não pode ser desconsiderado. A utilização de testes sorológicos para *N. caninum* tem sido realizada em diferentes espécies animais usando o teste ELISA com complexos imunoestimuladores (ISCOM) ou antígeno bruto e IFAT, considerado o teste de referência para anticorpos contra *N. caninum* (BJORKMAN et al., 1994; BJORKMAN & UGGLA, 1999).

No presente estudo, a presença de anticorpos contra *N. caninum* em diferentes grupos com altas taxas de infecção a *T. gondii* foram demonstrados utilizando-se diferentes testes sorológicos complementares. Foram utilizados valores de *cut-off* para ELISA-Nc (IE>1.1) e título de IFAT-Nc (> 1:100) baseando-se em estudos sorológicos prévios (LOBATO et al., 2006; NAM, KANG & CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999; MINEO, et al., 2001). Amostras de soros foram analisadas por WB-Nc e quando apresentavam dois de três antígenos imunodominantes (17, 29, 35 kDa) de *N. caninum* foram considerados positivos. Interessantemente, a ampla maioria das amostras de soros com resultados concordantes positivos (ELISA e IFAT positivos) reconheceu as três proteínas imunodominantes do parasito no teste WB.

Bjerkas e colaboradores (1994) têm demonstrado perfil similar de bandas reativas em várias espécies hospedeiras, incluindo bovinos, cães, cabras, porcos e carneiros que reconhecem predominantemente as bandas antigênicas de 17, 29-30, 37 e 46 kDa em todas as espécies analisadas. Em estudo prévio realizado com amostras de soro provenientes de indivíduos imunocompetentes, uma banda de 35-kDa foi encontrada, sendo esta considerada um antígeno imunodominante de *N. caninum* (TRANAS et al., 1999). Em recente estudo onde se avaliou a soropositividade para *N. caninum* em pacientes portadores do vírus HIV, foi demonstrada a presença de bandas imunodominantes para as proteínas de 29 e 35 kDa (LOBATO et al., 2006). No presente estudo, três proteínas foram consideradas imunodominantes como critério de positividade, a saber, os marcadores de 17, 29 e 35 kDa, conferindo uma maior

segurança no caráter de positividade das amostras testadas. Utilizou-se este critério em outros trabalhos (BJERKAS, JENKINS & DUBEY, 1994; HOWE et al., 1998).

Quando a presença de anticorpos IgG contra - *Neospora caninum* em pacientes imunodeprimidos foi detectada, observou-se maior soropositividade em pacientes portadores de HIV. Por outro lado, observou-se que em outros grupos de pacientes imunocomprometidos devido ao uso de drogas imunodepressoras, em função da presença de neoplasias e submissão a processos de hemodiálise, possuem um aumento da positividade contra - *N. caninum*, mas não significativa quando comparado ao grupo de doadores de sangue. Esta maior taxa de soropositividade em pacientes portadores do HIV foi também descrita previamente por Lobato e colaboradores (2006), sendo encontrada em 38% de indivíduos positivos para *N. caninum* em uma população de pacientes com HIV.

Acredita-se que este aumento da taxa de soropositividade para *N. caninum* em pacientes imunocomprometidos possa estar relacionada à capacidade de resposta imune ao nível das mucosas desses indivíduos.

Sabe-se que as mucosas representam a interface entre o organismo e o meio que o cerca, muitas vezes hostil, e os eventos imunológicos aí iniciados traduzem a fisiologia da operação do sistema imune. A mucosa intestinal possui várias funções, e dentre elas, a de maior significância para o sistema imune, seja desenvolver estratégias de defesa à entrada de patógenos. O principal isótipo de imunoglobulina encontrado neste local é a IgA que atua na superfície mucosa através de uma exclusão imune; primeira linha no reconhecimento antigênico e defesa a este. O sistema imune das mucosas consiste de agregados de linfócitos, macrófagos, e outras células acessórias localizadas abaixo do epitélio mucoso, bem como linfócitos intra-epiteliais difusamente espalhados. O protótipo destas estruturas é representado pelas placas de Peyer, agregados anatomicamente definidos de tecido linfóide associado à mucosa, na lâmina própria do intestino delgado. O epitélio intestinal ao redor das placas de Peyer é especializado de modo a permitir o transporte de antígenos para o tecido linfóide, função realizada por células epiteliais, denominadas células M. Essas células M são capazes de absorver e transportar antígenos, e possivelmente, processá-los e apresentá-los às células linfóides sub-epiteliais. Entretanto danos imunológicos causados em mucosas criam uma vulnerabilidade às doenças.

Quando estes indivíduos são infectados pelo HIV, a abundância de células susceptíveis de serem utilizadas para a replicação viral na mucosa acarreta um impacto

profundo do vírus no sistema imune após a infecção. Em macacos infectados com SIV, intravenosamente ou por uma via de mucosa, ocorre uma rápida e profunda perda de células T CD4⁺ intestinais, sendo a maioria delas destruídas em três semanas depois da infecção (KEWENIG et al., 1999; SMIT-MCBRIDE et al., 1985; VAJDW et al., 2000). A depleção de células T CD4⁺ ocorrida na mucosa nesta fase é muito maior em proporção quando comparada com a depleção destas células no sangue periférico, nódulos linfáticos ou no baço, e ocorre rapidamente (SMIT-MCBRIDE et al., 1985; VAJDW et al., 2000). Esta significativa destruição de células T CD4⁺ na mucosa intestinal facilita a entrada de patógenos, uma vez que o déficit da imunidade local leva frequentemente o indivíduo a desenvolver infecções oportunistas. Além disso, estas mudanças podem ser responsáveis pela atrofia parcial da mucosa intestinal e por déficits no processo de maturação de enterócitos, observados em pacientes infectados com o HIV. Estas observações corroboram a existência da inter-relação entre o sistema imune de mucosa e o epitélio. Portanto, estas informações nos levam a uma possível explicação da alta prevalência de *N. caninum* em pacientes portadores do vírus HIV, considerando a transmissão do *N. caninum* por uma via oral-intestinal. Devido a uma considerável perda da proteção de mucosa nestes pacientes, *N. caninum* parece ser um eficiente patógeno oportunista para este grupo de pacientes.

Em contraste com os outros grupos de pacientes analisados no presente estudo, a alta taxa de soropositividade encontrada no grupo de pacientes infectados com o HIV pode estar refletindo um aumento no processo de soroconversão neste grupo, apesar de poder existir um grau semelhante de exposição ao *N. caninum* nos diversos grupos de pacientes estudados.

A segunda maior taxa de soropositividade para *N. caninum* foi observada em pacientes oncológicos. Estes pacientes apresentavam diversos tipos de neoplasias, dentre elas câncer bucal com metástase no sistema respiratório, câncer gástrico, câncer de colo uterino, adenocarcinoma na próstata, câncer na próstata com metástase no esôfago, melanoma com metástases e linfoma de Hodgkin. Destes sete tipos de neoplasias, 4 delas foram localizadas em mucosas.

Não se sabe ao certo por que portadores de neoplasias têm uma soropositividade maior para *N. caninum*, mas todos os fatores que levam estes pacientes terem uma falha no sistema imune e principalmente em mucosas, poderia estar facilitando uma maior susceptibilidade ao *N. caninum*. Isto também ocorre quando estes pacientes estão expostos à microorganismos oportunistas.

A AIDS e neoplasias linfoproliferativas são exemplos de condições causadoras de anormalidades em praticamente todos os compartimentos do sistema imune. Estas patologias levam predominantemente a defeitos comprometendo linfócitos T. A terapia antineoplásica administrada nestes pacientes e a má nutrição gerada pela doença de base representam importantes co-fatores na predisposição e desenvolvimento de infecções (FERREIRA & BORGES, 2002).

O grupo de pacientes em hemodiálise também apresentou uma tendência a um aumento de soropositividade ao *N. caninum*. Assim, pacientes que passam por processos de hemodiálise possuem uma depressão da resposta imune humoral e celular, estando também mais susceptíveis à infecções. Há estudos recentes na literatura demonstrando uma maior taxa de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* neste grupo de pacientes, onde se descreve uma alta prevalência da infecção pelo *T. gondii* em pacientes em hemodiálise, levando-os a apresentar uma taxa de soroconversão maior também contra este protozoário (OCAK et al., 2005).

Considerando que a taxa de soropositividade a *N. caninum* no grupo de pacientes transplantados não diferiu significativamente do grupo de doadores de sangue, bem como dos grupos de pacientes oncológicos e em processo de hemodiálise, pode-se admitir que, apesar do fato de que a utilização de drogas imunodepressoras prejudique a proteção do organismo contra patógenos, *N. caninum* não parece ter uma via facilitada em pacientes transplantados sob terapia imunodepressora.

Os doadores de sangue apresentaram uma baixa soropositividade. Estes resultados são muito semelhantes à prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* encontrada em indivíduos imunocompetentes (TRANAS et al., 1999; NAM, KANG & CHOI, 1998; LOBATO et al., 2006), sugerindo que, apesar de uma exposição ambiental semelhante, o processo de soroconversão neste grupo de indivíduos possa não estar ocorrendo.

Apesar de todos os grupos de pacientes considerados imunodeprimidos no presente estudo, cada grupo apresenta processos diferenciais de imunodepressão, que podem levar a mudanças ou falhas em processos imunes diferentes. Acredita-se que o dano na mucosa seja uma via facilitada para o *Neospora* na espécie humana, porém nem todos pacientes imunodeprimidos terão um déficit de imunidade de mucosas. Isso pode ser um dos fatores causadores de diferenças nas taxas de soropositividades entre os grupos de pacientes imunodeprimidos.

Na AIDS, resultante de um estado de imunodepressão mais severo da infecção pelo HIV, tem sido identificado centenas de microorganismos causadores de infecções oportunistas, sendo que vários deles são protozoários intracelulares (FERREIRA & BORGES, 2002).

No presente estudo, a prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em pacientes imunodeprimidos encontrou-se aumentada significativamente nos grupos de transplantados, oncológicos e pacientes em hemodiálise quando comparada com doadores de sangue, enquanto a prevalência nos grupos de pacientes HIV positivos e de doadores de sangue não apresentou diferença significativa. Há diversos trabalhos descritos na literatura demonstrando um aumento da soropositividade de *T. gondii* em pacientes com câncer (ISRAELSKI et al., 1993; YAZAR et al., 2004), em pacientes transplantados (PONTICELLI & CAMPISE, 2005) e em pacientes em hemodiálise (YAZAR et al., 2003; ESPOSITO et al., 1987). As razões que explicam este aumento de soropositividade ainda permanecem obscuras. Pode ser que isso ocorra devido ao aumento da susceptibilidade ao *T. gondii* nestes grupos de pacientes.

Na infecção pelo *T. gondii*, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ agem sinergisticamente no seu controle, evitando-se uma reativação da doença (ARAÚJO & REMINGTON, 1991; GAZZINELLI et al., 1991). Estes grupos de linfócitos produzem níveis significativos de IFN- γ , que é a citocina responsável pela ativação de macrófagos que, por sua vez, promovem a morte do parasito. A reativação da infecção ocorre devido a uma redução na expressão de IFN- γ , resultando em falhas no processo de ativação de macrófagos e células gliais (GAZZINELLI et al., 1993). Dentre os grupos de indivíduos imunocomprometidos o maior problema relacionada ao *T. gondii* é a reativação desta infecção. Nesta fase pode ocorrer um aumento dos níveis de IgG contra *T. gondii* presente no soro, porém não suficientes para impedir a reativação da doença (WONG et al., 1984).

Mesmo que a reativação desta patologia aumente os níveis de IgG, a frequência de indivíduos soropositivos não é alterada. Estes indivíduos realmente podem ser mais susceptíveis à infecção pelo *T. gondii*.

No presente estudo, o grupo de pacientes infectados pelo HIV não apresentou aumento significativo da soropositividade para *T. gondii*, diferentemente dos outros grupos de imunocomprometidos. Isto pode acontecer devido àquele grupo ser mais jovem que os demais, tendo menor tempo para exposição ao parasito.

Inúmeras diferenças biológicas entre *N. caninum* e *T. gondii* estão sendo relatadas na atualidade, porém muitas ainda continuam desconhecidas. Os resultados descritos no presente trabalho, revelaram uma taxa de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* maior em pacientes infectados pelo HIV e tende a estar aumentada em outros grupos de imunocomprometidos, o que leva a crer na necessidade de uma queda na capacidade de resposta do sistema imune para promover uma soroconversão para este parasito. Isto não ocorre na infecção pelo *T. gondii*, uma vez que este parasito pode levar à soroconversão tanto indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos, e nestes últimos aparecem com uma maior frequência.

Nota-se que os índices ELISA para *N. caninum* (IE = 1,1 - 3,1) obtidos em amostras de soro humano foram baixos comparados com os de *T. gondii* (IE = 1,4-12,9) sugerindo uma baixa replicação do primeiro e uma possível exposição sem infecção. Estes dados também são importantes para diferenciar o grau de imunogenicidade frente a estes dois parasitos, sendo que *N. caninum* aparenta ter uma redução da complexidade antigênica. Tranas (1999) sugere que os baixos títulos de anticorpos contra *N. caninum* pode ser devido a infecções passadas que foram superadas ou inativas, ou devido à ingestão de parasitos não viáveis, ou então que a resposta humoral sistêmica contra este parasito permanece baixa devido a uma restrição da infecção pela mucosa gastrointestinal. Adicionalmente, pode-se dizer que os baixos títulos de anticorpos contra *N. caninum* em humanos possa estar ocorrendo devido a uma menor estimulação do sistema imune resultante de uma baixa carga parasitária infectante. Esta baixa carga infectante pode ser a baixa quantidade de cistos ingeridos presentes em carnes de hospedeiros intermediários ou devido a um baixo número de oocistos eliminados por cães que contaminam o ambiente.

No presente estudo, uma significativa associação entre a soropositividade de *N. caninum* e *T. gondii* foi observada em pacientes HIV positivos, oncológicos e em hemodiálise. Acredita-se que esta forte associação ocorra pelo fato destes pacientes estarem imunodeprimidos, levando-os a um aumento da susceptibilidade a patógenos oportunistas, como *T. gondii* e *N. caninum*. Por outro lado, ao se tentar estabelecer uma associação entre os resultados dos testes sorológicos para diversos patógenos em pacientes portadores do HIV soropositivos para *N. caninum*, não foi observada uma outra associação entre estes hospedeiros e outros microrganismos. Isso pode ocorrer devido a estes outros patógenos apresentarem vias de transmissões e uma interação parasito-hospedeiro diferentes de *N. caninum*.

Embora as formas taquizoítas de *T. gondii* e *N. caninum* expressem poucos antígenos com reatividade cruzada, os antígenos imunodominantes de ambos parasitos não reconhecem soros heterólogos (BJERKAS, JENKINS & DUBEY, 1994). Amostras de soros negativas para o teste ELISA/IFAT apresentaram marcações de proteínas de alto peso molecular pelo teste de *Western blot*. Estas marcações não tinham uma relação com a positividade de *T. gondii*. Pode ser que estas proteínas sejam filogeneticamente conservadas natureza, sendo conseqüentemente expressas em vários organismos. O caráter de positividade não foi alterado devido à presença destas proteínas de alto peso molecular, visto que *N. caninum* possui antígenos imunodominantes específicos (17, 29 e 35 kDa) presentes em amostras de soros positivas.

No presente trabalho, evidenciou-se que *N. caninum* é capaz de promover a infecção e soroconversão na espécie humana. Embora esta doença ainda não tenha sido descrita, diferenças entre *N. caninum* e *T. gondii* tem sido consideradas, principalmente para distinguir características epidemiológicas. Neste contexto, enquanto esta questão não seja totalmente esclarecida, os procedimentos adotados em relação ao contato de pacientes imunodeprimidos e felídeos, no caso da prevenção da toxoplasmose, devem também ser adotados medidas semelhantes no que se refere ao contato de cães e estes grupos de pacientes, quando se pretende prevenir a infecção por *N. caninum*, particularmente quando estes animais estão em contato com pacientes HIV positivos.

6.0 CONCLUSÕES

- ❖ Pacientes infectados pelo vírus HIV apresentam taxas de soropositividade a *N. caninum* significativamente elevadas;
- ❖ Pacientes imunodeprimidos transplantados, oncológicos e em processo de hemodiálise demonstram uma tendência a apresentar um aumento nas taxas de soropositividade a *N. caninum*;
- ❖ Indivíduos imunocomprometidos podem apresentar infecções concomitantes com *N. caninum*;
- ❖ O potencial zoonótico da soroconversão a *N. caninum* em desenvolver doença clinicamente manifestada deve ser investigada em estudos prospectivos.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, M. L., ANDRIANARIVO, A. G., CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60, p. 417-431, 2000.

ARAUJO, F. G., REMINGTON, J. S. Synergistic activity of azithromycin and gamma interferon in murine toxoplasmosis. **Antimicrob Agents Chemother.** v.35, p.1672-1713, 1991.

BARR, B. C., CONRAD, P. A., SVERLOW, K. W., TARANTAL, A. F., HENDRICKX A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Lab Invest.** 7 v.1, p.236-242, 1994.

BJERKAS, I., MOHN, S.F., PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd.**, v.70, p.271-274, 1984.

BJERKAS, I., PRESTHUS, J. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand**, v.96, p.445-454, 1988.

BJERKAS, I., JENKINS, M. C., DUBEY, J. P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.1, p.214-221, 1994.

BJORKMAN, C., LUNDEN, A., HOLMDAHL, J., BARBER, J., TREES, A. J., UGGLA, A. *N. caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite Immunol.**, v.16, p. 643-648, 1994.

BJORKMAN, C., UGGLA, A. Serological diagnosis of *N. caninum* infection. **Int. J. Parasitology**, v.29, p.1497-1507, 1999.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BUXTON, D., MALEY, S. W., THOMSON, K. M., TREES, A. J., INNES, E. A. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **J. Comp. Pathol.**, v. 117, p. 1-16, 1997.

CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.6, p.117-118, 1964.

CHAVES-BORGES, F. A., MINEO, J.R. **Medidas de biossegurança em laboratórios.** Uerlândia: Gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55pp.

COLE, R. A., LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L., DUBEY, J.P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. **J. Parasitol.**, v.81, p. 730-732, 1995a.

COLE, R. A., LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L., SORJONEN, D. C., DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **J. Parasitol.**, v. 81, p. 208-211, 1995b.

DIJKSTRA, T., BARKEMA, H. W., EYSKER, M., HESSELINK, J. W., WOUDE, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Vet Parasitol.**, v. 105, p. 99-104, 2002.

DOBBELSTEIN, H., HORNER, W. F., MEMPEL, W. Vitamin B6 deficiency in uraemia. **Kidney Inst.**, v. 5, p. 233-239, 1974.

DOUEK, D.C., PICKER, L.J., KOUP, R.A. T cell dynamics in HIV – 1 infection. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 265 – 304, 2003.

DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Vet. Parasitology**, v.84, p.349–367, 1999.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora* and neosporosis in animals. **Korean J Parasitol**, v.41, p.1–16, 2003.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. **Am J Vet Res**, v.50, p. 1578-1579, 1989a.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. **J. Parasitol.**, v. 75, p. 765-771, 1989b.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D., S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 230-233, 1990.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.193, p.1259-1263, 1988.

DUBEY, J. P., ABBITT, B., TOPPER, M. J., EDWARDS, J. F. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum* infection in an aborted bovine fetus. **J. Comp. Pathol.**, v. 118, p. 169-173, 1998.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **Int J Parasitol**, v.32, p.929-946, 2002.

ESPOSITO R, ORLANDO G, INZOLI C, CALELLO G, MORONI M, RIVOLTA E, ALKABES M. Asymptomatic parasitic infections in renal transplant recipients and in haemodialysis patients. **Boll Ist Sieroter Milan**. v.66, p. 210-213, 1987.

FERREIRA, M., S., BORGES, A., S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 443-457, 2002.

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

GAZZINELLI, R. T., ELTOUM, I., WYNN, T. A., SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **J Immunol**. v.151, p.3672-3681, 1993.

GONDIM, L. F, GAO,L., Mc ALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **J. Parasitol.**, v. 88, p.1159-63, 2002.

GONDIM,L. F, McALLISTER, M. M., PITTI, W. C., ZEMLICH, D. E. Coiotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v.34, p. 159-161, 2004a.

GONDIM, L. F., MCALLISTER, M. M., ANDERSON-SPRECHER, R. C., BJORKMAN, C., LOCK, T. F., FIRKINS, L. D., GAO, L., FISCHER, W. R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. **J Parasitol**, v. 90, p. 1394-1400, 2004b.

HANICKI, Z., CICHOCKI, T., SARNECKA-KELLER, M. Influence of middle-sized molecule on lymphocyte transformation. **Nephron**, v. 17, p. 73-80, 1976.

HOWE, D.K., CRAWFORD, A.C., LINDSAY, D.S., SIBLEY, L.D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.** v. 66, p. 5322-5328, 1998.

HUANG, H., YAN, F. H., LI, C. J., ZHAO, M. Y., TANG, J. W., LI, X. R. Detection of *Toxoplasma* infection in woman with gynaecol neoplasms using ELISA. **Zhongguo Ji Sheng Chong Bing Fang Zhi Za Zhi**, v. 18, p. 165-166, 2000.

INNES, E. A., PANTON, W. R., MARKS, J. TREES, A. J., HOLMDAHL, J., BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. **J. Comp. Pathol.**, v. 113, p. 95-100, 1995.

INNES, E.A., ANDRIANARIVO, A.E., BJÖRKMAN C., WILLIAMS, D.J.L., CONRAD, P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Parasitology**, v.18, No.11, p.497-503, 2002.

ISRAELSKI, D. M., CHMIEL, J. S., POGGENSEE, L., PHAIR, J.P., REMINGTON, J. S. Prevalence of Toxoplasma infection in a cohort of homosexual men at risk of AIDS and toxoplasmic encephalitis. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v .6, p. 414-418, 1993.

JENSEN, L., JENSEN, T. K., LIND, P., HENRIKSEN, S. A., UGGLA, A. BILLE-HANSEN, V. Experimental porcine *neosporosis*. **A. P. MIS.**, v. 106, p. 475-482, 1998.

KHAN, I. A., SCHWARTZMAN, J. D., FONSEKA, S., KASPER, L. H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Exp. Parasitol.**, v. 85, p. 24-34, 1997.

KEWENIG, S., SCHNEIDER, T., HOHLOCH, K., LAMPE-DREYER, K., ULLRICH, R., STOLTE, N., STAHL-HENNIG, C., KAUP, F. J., STALLMACH, A., ZEITZ, M. Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. **Gastroenterology**. v.116, p.1115-1123, 1999.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LIDDELL, S., JENKINS, M. C., DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neopora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 550-555, 1999.

LINDSAY, D. S., RIPPEY, N. S., POWE, T. A., SARTIN, E. A., DUBEY, J. P., BLAGBURN, B. L. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, p. 1176-1180, 1995.

LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1521–1523,1999.

LINDSAY, D.S., RITTER, D.M., BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*, **J. Parasitol.**, v.87, p.909–911, 2001.

LOBATO, J., SILVA, D. A. O, MINEO, T. W. P., AMARAL, J. D. H. F., SILVA SEGUNDO, G. R., COSTA-CRUZ, J. M., FERREIRA, M. S., BORGES, A. S., MINEO, J. R., 2006. Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: High Seropositivity Rates in Patients Who Are Infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. **Clin. Vaccine Immunol.**, v, 1, p. 84-89, 2006.

LONG, M. T., BASZLER, T. V. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, V. 82, v. 608-611, 1996.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v.193, p. 265-275, 1951.

MACIEL, E., SIQUEIRA, I., QUEIROZ, A., C., MELO, A. *Toxoplasma gondii* Mielitis in a Patients with Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v.58, p. 1107-1109, 2000.

MAGALHÃES, F. B., JESUS, E. E. V., ALMEIDA, M.A.O.; ATTA, A.M.; GONÇALVES, M.S. Serologic Evidences of Human *Neospora caninum* Infection in Brazil. IN: **Intern. Symp. On Allergy And Clinical Immunology**, 5, 2002, Bahia, Brasil.

MANFRO, R. C., NORONHA, I. L., SILVA FILHO, A. P., **Manual de Transplante Renal**. Ed. Manole, p. 81-129. 2003, Brasil.

McALLISTER, M. M., DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., JOLLEY, W. R., WILLS, R. A., MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitology.**, v.28, p.1473-1478, 1998a.

McALLISTER, M. M., JOLLEY, W. R., WILL, R. A., LINDSAY, D.S., MCGUIRE, A. M., TRANAS, J. D. Oral inoculation of cats with tissue cysts of *N. caninum*. **Am. J. Vet. Rec.**, v. 58, p. 441-444, 1998b.

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

MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; COSTA, G.H.N.; von ANCKEN, A.C.B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.98, p.239-245, 2001.

NAM, H.; KANG, S. ; CHOI, W. Antibody reaction of human anti – *Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **Kor. J. Parasitol.**, v.36, n.4, p.269-275, 1998.

OCAK, S., DURAN, N., ESKIOCAK, A. F., AYTAC, H. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in hemodialysis patients receiving long-term hemodialysis therapy in Turkey. **Saudi Med J.** v26, p. 1378-1382, 2005.

PETERS, M., LUTKEFELS, E., HECKEROTH, A.R., SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p.1144–1148, 2001.

PONTICELLI, C., CAMPISE, M. R. Neurological complications in kidney transplant recipients. **J Nephrol.**, v.18, p. 521-528, 2005.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunol. Today.** v. 18, p. 478-482, 1997.

RENOLT, E.; GEORGES, E.; BIAVA, M. F. Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: report of six cases and review. **Clin Infect Dis**, v. 24, p. 625-634, 1997.

SCOTT, P., PEARCE, E., NATOVITZ, P. SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in murine model. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **J. Immunol.**, v.139, p.221-227, 1987.

SILVA, D.A.O; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.P.; PAJUABA NETO, A.A.; FERRO, A.V.; MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Vet. Parasitol.**, v.107., p.181-195, 2002.

SLAPETA, J.R., MORDÍ, D., KYSELOVÁ, I., HOREJS, R., LUKES, J., KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *N. caninum* : PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Vet. Parasitol**, v. 109, p. 157 – 167, 2002.

SMIT-MCBRIDE, Z., MATTAPALLIL, J. J., MCCHESENEY, M., FERRICK, D., DANDEKAR, S. SPEER, C. A., REDUKER, D. W., BURGESS, D. E., WHITMIRE, W. M., SPLITTER, G., A. Lymphokine-induced inhibition of growth of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apicomplexa) in cultures bovine monocytes. **Infect. Immun.**, v.50, p.566-571, 1985.

SPEER, C.A.; REDUKER, D.W.; BURGESS, D.E.; WHITMIRE, W.M.; SPLITTER, G.A. Lymphokine-induced inhibition of growth of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apicomplexa) in cultures bovine monocytes. **Infect. Immun.**, v.50, p.566-571, 1985.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.76, p.4350-4356, 1979.

TRANAS.J., HEINZEN,R.A., WEISS L.M., MCALLISTER, M..M., Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clin.and Diagn. Labor.Immun.**,v.6, p. 765–767, 1999.

UGGLA, A., STENLUND, S., HOLMDAHL, O. J., JAKUBEK, E., B., THEBO, P., KINDAHL, H., BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **Int. J. Parasitol**, v. 28, p. 1467-72, 1998.

VAJDY, M., VEAZEY, R. S., KNIGHT, H. K., LACKNER, A. A., NEUTRA, M. R., WEGMANN, T. G. Bidirectional cytokine interactions in the maternal–fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol. Today**, v.14, p.353–356, 1993.

WILSON, W. E. C., KIRPATRICK, C. H., TALMAGE, D. W. Supression of immunologic responsiveness in uremia. **Ann Intern Med**, p. 62-71, 1969.

WEINRACH, D. M., OVIEDO, A., Toxoplasmosis in a Bone Marrow Transplant Patient. **Arch. Pathol. Lab. Med**, v. 125, p. 707, 2001.

WONG, B., GOLD, J. W., BROWN, A. E., LANGE, M., FRIED, R., GRIECO, M., MILDVAN, D., GIRON, J., TAPPER, M. L., LERNER, C. W. Central-nervous-system toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. **Ann Intern Med**. v.100, p. 36-42, 1984.

WOUDA, W. Neospora abortion in cattle. **Tijdschr Diergeneeskd**. v.122, p. 446-448, 1997.

YAZAR, S., DEMIRTAS, F., YALCIN, S., YAMAN, O., TOKGOZ, B., UTAS, C., Anti-Toxoplasma gondii Antibodies in Haemodialysis Patients with Chronic Renal Failure. **Yonsei Med J**, v.44, p. 288-292, 2003.

YAZAR, S., YAMAN, O., ESER, B., ALTUNTAS, F., KURNAZ, F., SAHIN, A. Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Patients with Neoplasia. **J Med Microbiol**, v.53, p. 1183-1186, 2004.

ZHANG, X., LI, Q., HU, P., CHENG, H., HUANG, G. Two case reports of pituitary adenoma associated with *Toxoplasma gondii* infection. **J. Clin. Pathol**, v. 55, p. 965-966, 2002.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia

Av. Para, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG

Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado **“Prevalência de anticorpos anti - *Neospora caninum* em humanos”**, cujo principal objetivo é observar a soroprevalência de anticorpos anti – *Neospora caninum* em amostras de soros humanos.

Estou ciente de todos os procedimentos abaixo relacionados aos quais serei submetido (a) e que serão realizados no Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umuarama, Bloco 4C, a saber, da:

- Necessidade de coleta de sangue para dosagem de anticorpos específicos para *Neospora caninum*.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação. Terei a liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar, sem a necessidade prévia de explicações.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

ASSINATURA

TESTEMUNHA

ANEXO 2

FICHA DO PACIENTE ONCOLÓGICO

Nome: _____ Data ____/____/____

Naturalidade: _____ Data de nascimento ____/____/____

Sexo: () feminino () masculino Paciente : () internado () ambatório () óbito

Contato com animal doméstico? _____ Qual ? _____

O paciente toma ou tomou leite in natura? _____

Tipo câncer: _____ Tempo de tratamento: _____

Medicamentos: _____

Já fez () quimioterapia? Quanto tempo? _____

() radioterapia? Quanto tempo? _____

Exames sanguíneos

- *Sorológicos*

Anti _ HIV _____ Há quanto tempo : _____

V.D.R.L _____

T. Cruzei _____ Método _____

HBs/ Ag _____

Toxoplasmose (IgG) _____ (IgM) _____

Outros exames sorológicos positivos :

- Hemograma

Leucócitos _____

Bastonetes : _____

Segmentados : _____

Hematócrito _____

Eosinófilos : _____

Basófilos : _____

Hemoglobina _____

Linfócitos : _____

Monócitos: _____

- Parasitológico

Sinais e sintomas clínicos :

Laudo da Tomografia do crânio :

Diagnóstico médico :

FICHA DO PACIENTE TRANSPLANTADO

Nome: _____

Prontuário: _____ Data nascimento: _____

Transplantado : () sim () não Quantas vezes : _____

Órgão transplantado: _____ Tempo do último transplante: _____

Usa imunossupressores: _____ Quais: _____

Há quanto tempo: _____ Houve rejeição: _____

Contato com animal doméstico ? _____ Qual ? _____

O paciente toma ou tomou leite in natura ? _____

Exames sanguíneos

● Sorológicos

Anti _ HIV _____ Há quanto tempo : _____

V.D.R.L _____

T. Cruzei _____ Método _____

HBs/ Ag _____

Toxoplasmose (IgG) _____ (IgM) _____

Outros exames sorológicos positivos :

● Hemograma

Leucócitos _____

bastonetes : _____

Segmentados : _____

Hematócrito _____

Eosinófilos : _____

Basófilos : _____

Hemoglobina _____

Linfócitos : _____

Monócitos : _____

● Parasitológico

Observações:

FICHA DO PACIENTE COM HIV

Nome: _____ Data ____/____/____

Naturalidade: _____ Data de nascimento ____/____/____

Sexo : () feminino () masculino Paciente : () internado () ambulatório () óbito

Contato com animal doméstico ? _____ Qual ? _____

O paciente toma ou tomou leite in natura ? _____

Contagem de células atual: CD4 _____ CD8 _____ Relação CD4/CD8 _____

Carga Viral _____ Log C.V _____

Exames sanguíneos

- *Sorológicos*

Anti _ HIV _____ Há quanto tempo : _____

V.D.R.L _____

T. Cruzi _____ Método _____

HBs/ Ag _____

Toxoplasmose (IgG) _____ (IgM) _____

Outros exames sorológicos positivos :

- Hemograma

Leucócitos _____

bastonetes : _____

Segmentados : _____

Hematócrito _____

Eosinófilos : _____

Basófilos : _____

Hemoglobina _____

Linfócitos : _____

Monócitos : _____

- Parasitológico

Sinais e sintomas clínicos :

Laudo da Tomografia do crânio :

Diagnóstico médico :

FICHA DO PACIENTE EM HEMODIÁLISE

Nome: _____

Prontuário: _____ Data nascimento: _____

Naturalidade: _____ Data : _____

Faz hemodiálise: () sim () não Há quanto tempo: _____

Contato com animal doméstico? _____ Qual? _____

O paciente toma ou tomou leite in natura ? _____

Exames sanguíneos

- *Sorológicos*

Anti _ HIV _____ Há quanto tempo : _____

V.D.R.L _____

T. Cruzi _____ Método _____

HBs/ Ag _____

Toxoplasmose (IgG) _____ (IgM) _____

Outros exames sorológicos positivos :

- Hemograma

Leucócitos _____

bastonetes : _____

Segmentados : _____

Hematócrito _____

Eosinófilos : _____

Basófilos : _____

Hemoglobina _____

Linfócitos : _____

Monócitos : _____

- Parasitológico

Observações:

FICHA DO DOADOR DE SANGUE

Nome: _____ Data ____/____/____

Naturalidade: _____ Data de nascimento ____/____/____

Sexo: () feminino () masculino Doador a quanto tempo? _____

Contato com animal doméstico? _____ Qual ? _____

O paciente toma ou tomou leite in natura? _____

Toma algum medicamento? _____

Exames sanguíneos

● *Sorológicos*

Anti _ HIV _____ Há quanto tempo : _____

V.D.R.L _____

T. Cruzei _____ Método _____

HBs/ Ag _____

Toxoplasmose (IgG) _____ (IgM) _____

Outros exames sorológicos positivos :

Observações: