



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

**ESTUDO PROTEÔMICO DE MARCADORES DA
TOXOPLASMOSE OCULAR**

MARIA DA CONCEIÇÃO GOMES LEITÃO

Orientadores:

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Profa. Dra. Silvana de Fátima Ferreira da Silva
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Julho 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

**ESTUDO PROTEÔMICO DE MARCADORES DA
TOXOPLASMOSE OCULAR**



MARIA DA CONCEIÇÃO GOMES LEITÃO

Tese de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, visando obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia.

Julho 2006

Leitão, Maria da Conceição Gomes

Estudo proteômico de marcadores da toxoplasmose ocular/ Maria da Conceição Gomes Leitão . – Recife : O Autor, 2006.

82 folhas. il., fig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas – Biotecnologia, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose ocular. 2. Eletroforese bidimensional. 3. Proteômica I. Título.

617.7

CDU (2.ed.)

UFPE

617.762

CDD (22.ed.)

CCB 069

ESTUDO PROTEÔMICO DE MARCADORES DA TOXOPLASMOSE OCULAR

Maria da Conceição Gomes Leitão
e-mail: mcgomesl@yahoo.com.br

Aprovada em:

Comissão examinadora:

Aprovada por:

Prof. Dr. Sérgio Crovella
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami –LIKA/ UFPE

Prof. Dr. Gandhi Radis Baptista
Universidade Federal de Pernambuco -UFPE, Deptº.de Bioquímica

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami –LIKA/ UFPE

Julho 2006

Recife, 06 de julho de 2006.

Ribana Perreira
 Sandra Vianna
 Wânia Albuquerque
 S. Olhans
 Patrícia Olney
 Alina S. de Medeiros
 Jara G. B. de Melo
 Riquita Pinto Ramos
 Ana M. G. Freitas
 Sônia Figueira
 Lyrmarda Caroline
 F. Lima
 J. J. Santos
 J. J. Santos
 J. J. Santos

Dedico em especial a minha família, pais, irmãos, sobrinho e cunhadas, pela paciência e amor a mim dedicado, o que foi primordial nesta conquista.

Enquanto houver sol

*Quando não houver saída
Quando não houver mais solução
Ainda há de haver saída
Nenhuma idéia vale uma vida
Quando não houver esperança
Quando não restar nem ilusão
Ainda há de haver esperança
Em cada um de nós, algo de uma
criança*

*Enquanto houver sol, enquanto
houver sol
Ainda haverá
Enquanto houver sol, enquanto
houver sol
Quando não houver caminho
Mesmo sem amor, sem direção
A sós ninguém está sozinho
É caminhando que se faz o caminho
Quando não houver desejo
Quando não restar nem mesmo dor
Ainda há de haver desejo
Em cada um de nós, aonde Deus
colocou.*

*Enquanto houver sol, enquanto
houver sol
Ainda haverá
Enquanto houver sol, enquanto
houver sol*

Sérgio Britto

	SUMÁRIO	<i>i</i>
	AGRADECIMENTOS	<i>iv</i>
	LISTA DE FIGURAS	<i>vi</i>
	RESUMO	<i>vii</i>
	ABSTRACT	
1.	INTRODUÇÃO	01
2.	<i>Toxoplasma gondii</i>	
2.1	BIOLOGIA PARASITARIA	04
2.2	MORFOLOGIA DO PARASITO	07
2.3	CICLO BIOLÓGICO	09
2.4	MECANISMOS DE TRANSMISSÃO	12
2.5	CEPAS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	14
2.6	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	16
3.	TOXOPLASMOSE	
3.1	Toxoplasmose em humanos	20
3.1.1	Toxoplasmose pós-natal no paciente imunocompetente	20
3.1.2	Toxoplasmose ocular	21
3.1.3	Toxoplasmose congênita	22
3.1.4	Toxoplasmose no imunocomprometido	24
4.	DIAGNOSTICO LABORATORIAL	26
4.1	Os exames sorológicos	27
4.1.1	A imunoglobulina G (IgG)	27
4.1.2	A imunoglobulina M (IgM)	28
4.1.3	As Imunoglobulinas A (IgA) e E (IgE)	29
4.1.4	Avidez de IgG	29
4.1.5	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	29
4.1.6	Isolamento e demonstração do Parasito	30
4.2	Diagnóstico laboratorial no paciente imunocompetente	30
4.3	Diagnóstico laboratorial da retinocoroidite	31
4.4	Diagnóstico laboratorial no imunocomprometido	33
4.5	Diagnóstico laboratorial na gravidez	34
4.6	Diagnóstico laboratorial no feto e recém-nato	35
5.	PROTEÔMICA	37
6.	PROTEÔMICA DO <i>Toxoplasma gondii</i>	43
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	CAPÍTULO 1: PROTEOMIC STUDY OF OCULAR TOXOPLASMOSIS MARKERS	66
	ABSTRACT	66
	INTRODUCTION	67
	MATERIALS and METHODS	69
	RESULTS	71
	DISCUSSION	74
	REFERENCES	76
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
9.	ANEXOS: INDICADORES DE PRODUÇÃO	80

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Jesus e Nossa Senhora da Conceição, pois eles me deram força para superar as horas mais difíceis que passei.

À minha Mãe que sempre esteve ao meu lado em todas as horas, ao meu Pai que agora está junto a Jesus e a Nossa senhora, mas vai sempre continuar olhando por mim. Mãe e Pai, obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Flávio e Fábio, sobrinhos Fernanda, Flávio Jr. E Fábio Jr., e cunhadas Patrícia e Taís, pela paciência, carinho, e por entenderem que em muitos momentos precisei estar ausente.

À minhas madrinhas e tias, pelas orações e minhas primas, pelo carinho e compreensão.

Ao professor José Luiz de Lima Filho, pela orientação, confiança a mim depositada, e incentivo e entusiasmo, em todas as horas, que tanto contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À professora Elizabeth Chaves, pela orientação, imensa calma, tranquilidade, conhecimentos e incentivo, em todos os momentos, que tanto contribuíram para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Em especial a Silvana, pela orientação, amizade, carinho, conhecimentos e incentivo, que foram fundamentais no meu crescimento pessoal e profissional. Pelo apoio na hora em que mais precisei.

À professora Elizabeth Malagueño pelo incentivo e carinho, por estar presente e me dar apoio na hora em que mais precisei.

À professora Ana Porto e professora da Paz pelo incentivo e carinho que tanto contribuíram para o meu crescimento.

À professora Elizabeth Malagueño pelo incentivo, conhecimentos e carinho, por estar presente e me dar apoio na hora em que mais precisei.

À minha amiga, Daniela Viana, pela amizade, carinho, força e apoio na hora em que eu mais precisei.

À Lillyane pela amizade, carinho, paciência e força que a mim sempre dedicou, e pelo apoio na hora em que eu mais precisei.

À minhas eternas amigas Socorro e Sandriana, que mesmo estando longe sempre me incentivaram com carinho, apoio e amizade.

À Cynarha e Catarina pela amizade, carinho e incentivo em todas as horas.

Às professoras do setor de Imunologia, Vláudia, Monica e Valdenia, pelos ensinamentos.

Aos colegas do setor de Imunologia, Poliana, Andréa, Narjara, Adrew, Fernanda, Juliana, Patrícia, Renata, Renan e Carol, pela colaboração.

A todos os amigos que fazem parte dos outros setores do LIKA, em especial, Biotecnologia, Bioquímica e Microscopia eletrônica.

A Sérgio e Rafael que tanto me ajudaram neste trabalho.

Aos Setores de Imunologia e Microbiologia do Aggeu Magalhães.

Aos funcionários do LIKA, Moisés, Seu Otaviano, Oscar, Vera, Cleide, Felipe, Ilma, Conceição, Isabel, Paulina, Dona Celestina, Paulo e Cláudio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

Toxoplasma gondii:

FIGURA 1: Esquema mostrando a ultra-estrutura do taquizoíto de *Toxoplasma. gondii*. 05

FIGURA 2: Invasão e replicação do taquizoíto na célula hospedeira. 06

FIGURA 3: Principais formas evolutivas do *T.gondii* 07

FIGURA 4: Ciclo do *Toxoplasma gondii* em ambos hospedeiros: completo (gato) e incompleto (aves, mamíferos e o homem). 10

FIGURA 5: Prevalência Global da Toxoplasmose (1993). 16

TOXOPLASMOSE:

FIGURA 6: Exantema maculo-papular por *T. gondii*. 21

FIGURA 7: Retinocoroidite por *T.gondii*. 21

FIGURA 8: Macrocefalia e dano visual. 23

FIGURA 9: Frequência dos anticorpos, no curso da primo-infecção pelo *T. gondii*. 28

FIGURA 10: Súmula do diagnóstico laboratorial em indivíduos imunocompetentes. 31

FIGURA 11: Súmula do diagnóstico laboratorial da retinocoroidite. 32

FIGURA 12: Súmula do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos. 33

FIGURA 13: Súmula do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose e gravidez. 35

FIGURA 14: Súmula do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose no recém-nato. 36

FIGURA 15: Esquema da primeira e segunda dimensão da 2D: Focalização das proteínas (a) de acordo com seu ponto isoelétrico (pI); em (b) é demonstrado a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular (Mr) 39

FIGURA 16: Estratégias para análise proteômica. 41

FIGURA 17: Estrutura da forma taquizoíta do *Toxoplasma gondii*. 44

FIGURA 18: Esquema da localização das proteínas secretadas e excretadas pelo *Toxoplasma gondii*. 45

CAPÍTULO 1:

FIGURA 1: Analytical gels of the two-dimensional immunoblotting (2DIB) 71

FIGURA 2: Gels analytical of the 2DIB from patients with APUPT (outlined-spots) and individuals without APUPT (crossed-spots). 72

FIGURA 3: Comparison of analytical gels of 2DIB from patients with APUPT. Proteins recognized by IgA antibodies (outlined-spots) and proteins recognized by IgG antibodies (crossed-spots). 73

FIGURA 4: Gels analytical of 2DIB of the proteins recognized for antibodies from the sera of patients with APUPT. 73

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) é um dos principais agentes causadores de Uveíte posterior Presumidamente por *T. gondii* (UPAPT) em diferentes partes do mundo. A infecção predomina em jovens da segunda e terceira década de vida e é considerada a maior causa de perda da acuidade visual e cegueira. O diagnóstico da fase ativa da toxoplasmose ocular é difícil de ser realizado. Os exames sorológicos fornecem uma informação valiosa para realizar o diagnóstico etiológico desta doença, mas freqüentemente, não são conclusivos. O parasito causa a infecção latente. Algumas proteínas identificadas atualmente pela biologia molecular convencional e, utilizadas como marcadores no diagnóstico laboratorial, não conseguem discriminar entre toxoplasmose ativa e crônica, dificultando a intervenção terapêutica no momento adequado. Estudos prévios melhoraram o diagnóstico da toxoplasmose congênita usando immunoblotting bidimensional (2DIB). Nós desenvolvemos um método de 2DIB com o antígeno de taquizoítos da cepa RH do *T. gondii* para investigar as diferentes respostas dos anticorpos IgA e IgG ao parasito usando o soro de pacientes com e sem UPAPT. 68% das proteínas antigênicas foram reconhecidas especificamente pelos anticorpos IgA presentes no soro de pacientes com UPAPT. Nossos dados sugerem que estas proteínas antigênicas podem ser usadas como possíveis marcadores no diagnóstico da toxoplasmose ocular ativa.

Palavras chave: proteômica, toxoplasmose ocular, eletroforese bidimensional

ABSTRACT

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) is one of the main causing agents of Active posterior uveitis presumably due to *Toxoplasma gondii* infection (APUPT) in different parts of the world. The infection predominates in young people, in the second and third decade of life and is considered the major cause of loss of the visual acuity and blindness. The diagnosis to active toxoplasmosis in patients with ocular toxoplasmosis it is fairly difficult. Serologic exams provide valuable information to distinguish the etiologic diagnosis of this disease, but more frequently cannot be ascertained. The parasite causes latent infection. Some proteins currently identified through conventional molecular biology, and used as markers do not discriminate between active and chronic toxoplasmosis, what make difficult the therapeutic intervention in the adequate moment. Previous studies improved the diagnosis of congenital toxoplasmosis using two-dimensional immunoblotting (2DIB). We developed a 2DIB method with tachyzoite antigen of *T. gondii* RH strain to investigate differentiation between IgA and IgG antibodies response to *T. gondii* using sera from patients with and without APUPT. 68% the antigenic proteins were recognized specifically by the IgA antibodies present in the UPAPT patients sera. Our data suggest that these antigenic protein can be used as possible markers in the diagnosis of active ocular toxoplasmosis.

Keywords: proteomic, ocular toxoplasmosis, electrophoresis two-dimesional

1. INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma infecção causada pelo *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), protozoário intracelular obrigatório, promotor de uma das protozooses mais cosmopolita. Essa infecção é extremamente comum entre os seres humanos, e também em várias espécies de animais (herbívoros, carnívoros e onívoros). Dentre os felinos, no nosso habitat, apresenta como hospedeiro completo do parasito o gato doméstico (TENTER et al., 2000).

A Toxoplasmose é uma infecção pandêmica, apresentando na sua maioria indivíduos assintomáticos. A população mundial apresenta índices de soropositividade que variam entre 20 a 90%, contribuindo para isto, hábitos sócio-culturais, alimentares, fatores geográficos e faixa etária (GIRALDO et al., 2000, TENTER et al., 2000, FERREIRA & BORGES, 2002, REMINGTON et al., 2004)

No Brasil 50 a 80% dos adultos são soros positivos (ORÉFICE & BONFIOLI, 2000). Em Pernambuco as taxas de prevalência em adultos é cerca de 75% (COELHO et al., 2003), e em crianças na faixa etária de 9 a 15 anos é de 79,1% (KOBAYASHI et al., 2002).

A Toxoplasmose apresenta diferentes formas clínicas, destacando-se a ocular, que pode ser de origem congênita, com manifestações clínicas precoces ou tardias, ou ainda, ser adquirida após o nascimento. Comumente, se conhece que a toxoplasmose ocular é resultado de reativação de uma infecção latente, em pacientes com infecção congênita. Todavia, lesões oculares também têm sido descritas em pacientes com infecção aguda (MONTROYA & REMINGTON, 1996; SILVEIRA et al., 1988). Em ambos os casos, a infecção ocular pode resultar em perda parcial ou completa da visão, ou em glaucoma (METS et al., 1996).

A manifestação clínica, mais comum, resultante da toxoplasmose ocular é a UPAPT – Uveíte Posterior Presumidamente pelo *Toxoplasma gondii* (LYNCH et al., 2004). A proliferação do parasito provoca necrose celular resultando retinites necrotizantes, comprometendo as estruturas subjacentes, e levando ao termo de retinocoroidite toxoplásmica (TABBARA, 1990).

No Brasil, cerca de 50 a 80% das uveítes têm como origem etiológica o *T. gondii* (LYNCH et al. 2004, ABREU et al.1987, TENTER et al. 2000). A região sul é uma das mais afetadas por esta forma clínica. Estudos epidemiológicos realizados na população de Erechim, no Rio Grande do Sul, revelaram que 95% da população apresentou-se soropositivo para *T.gondii* e 20% desta, apresentava toxoplasmose ocular. Segundo os autores, esta prevalência é 30 vezes mais alta do que as observadas em outras regiões do mundo (YAMAMOTO et al., 2000).

O diagnóstico da Toxoplasmose ocular, freqüentemente, é apoiado em aspectos clínicos típicos, com a presença de uma lesão ativa, branco-amarelada, com cicatriz pigmentada e perivasculite. Entretanto, outras causas podem conduzir ao mesmo aspecto clínico. O diagnóstico laboratorial vem auxiliar no diagnóstico diferencial de tais lesões (LYNCH et al., 2004).

Os testes sorológicos são, no momento, a principal ferramenta laboratorial no diagnóstico da Toxoplasmose. Entretanto, ainda apresentam dificuldades em discriminar entre a toxoplasmose ativa (aguda ou reativa) e crônica (latente). Frequentemente os testes sorológicos utilizam como antígeno o extrato de proteínas totais do parasito, desse modo, ainda apresentam lacunas em relação a identificação de fases específicas da infecção. As lesões oculares causadas pelo *T. gondii* podem apresentar-se de forma grave e até mesmo irreversível, desse modo, o diagnóstico precoce da infecção é de fundamental para a

intervenção terapêutica no momento adequado (ABREU et al., 1987; KUSSENHLATT et al., 1994).

Atualmente, a identificação de proteínas antigênicas específicas de cada fase evolutiva do *T. gondii*, e conseqüentemente, de cada fase da infecção, vem sendo realizada através de estudos proteômicos. A análise proteômica vem auxiliando ainda, na compreensão da patogênese da Toxoplasmose, na identificação de proteínas de transição do bradizoíto para taquizoíto, e no conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune do hospedeiro contra a infecção (COHEN et al., 2002; ZHOU et al., 2004).

NIELSEN et al. (2005), realizaram estudos proteômicos para o diagnóstico da Toxoplasmose congênita. Os resultados obtidos permitiram identificar perfis diferentes de expressão protéica comparando os soros de mães, soro convertido durante a gestação, e soros de seus respectivos recém-nascidos infectados, levando os autores a sugerirem a utilização da eletroforese 2D, seguida de Western blotting, como uma nova opção no diagnóstico da Toxoplasmose congênita.

Com base no exposto, o presente estudo se propôs identificar proteínas antigênicas, de taquizoítos do *T. gondii*, marcadoras de fase ativa da infecção, reconhecidas por soros de indivíduos com lesão ocular (UPAPT- casos) e sem lesão ocular (sem UPAPT - controles), através da análise proteômica (eletroforese bidimensional / 2-D e Western blotting).

2.1. BIOLOGIA PARASITÁRIA

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Eucoccidia, é um parasito obrigatório capaz de infectar aves e mamíferos, inclusive o homem (COUTINHO & VERGARA, 2005).

Este parasito foi descrito inicialmente por NICOLLE e MANCEAU em 1908, presente em células do baço e fígado de um roedor norte-africano, *Ctenodactylus gondii*. Em 1909, eles introduziram o gênero *Toxoplasma* com a espécie *T. gondii*. No Brasil, quase respectivamente, SPLENDORE, também descreveu o mesmo parasito a partir de coelhos mantidos em laboratório, e o denominou *Toxoplasma cuniculi*. (KAWAZOE, 2005).

Durante vários anos, inúmeras espécies de *Toxoplasma* foram nomeadas principalmente de acordo com a espécie de hospedeiro dos quais eles foram captados (TENTER et al., 2000). SABIN, na década de 30, desenvolveu estudos de comparação imunológicas e biológicas, do *Toxoplasma*, e estes forneceram evidências de que os vários parasitos tanto de origem animal quanto de humano eram idênticos (HINRICHSSEN, 2001).

Os casos da doença passaram a serem descritos em 1923, quando o oftalmologista JANKU, observou lesões oculares em um paciente. WOLF & COWEN, em 1937, relataram casos de crianças em que, provavelmente, a transmissão congênita havia ocorrido. No Brasil, importantes contribuições foram feitas, principalmente por TORRES, em 1927, quando fez as primeiras descrições anatomo-patológicas da doença, e por DELASCIO, em 1956, com detalhadas informações sobre a forma congênita. SABIN & FELDMAN, em 1948, desenvolveram o teste sorológico (teste do corante ou reação de Sabin-Feldman) possibilitando a associação das várias apresentações clínicas da doença à etiologia pelo *T. gondii*.

Estudos realizados sobre os mecanismos de transmissão do *T. gondii* foram apresentados em 1960. No final da década de 60, os gatos foram considerados hospedeiros definitivos, devido a relatos do encontro de oocistos (forma evolutiva proveniente da reprodução sexuada do parasito), em suas fezes.

A classificação Sistemática do parasito (**Fig.1**) está assim compreendida: Reino: **Protista**; Filo: **Apicomplexa**; Classe: **Sporozoa**; Ordem: **Eucoccidiida**; Família: **Sarcocystidae**; Gênero: ***Toxoplasma***; Espécie: ***T. gondii*** (REY, 2002).

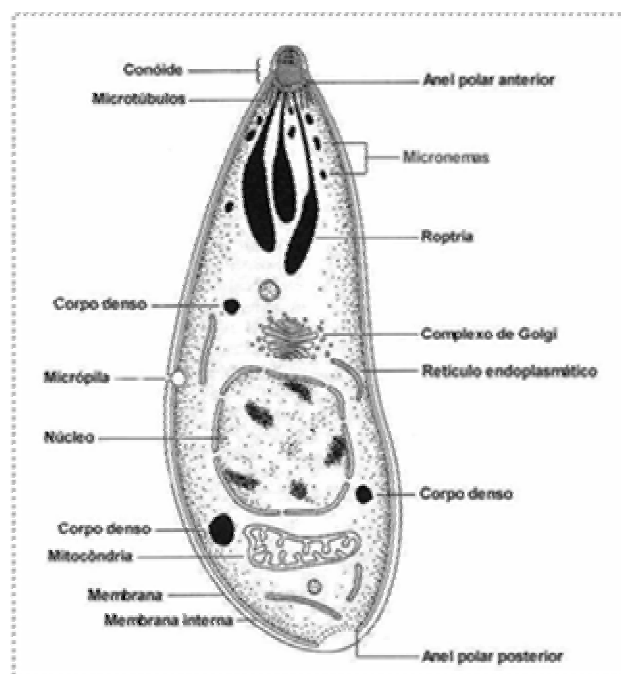


Figura 1: Esquema mostrando a ultra-estrutura do *Toxoplasma gondii*.

Fonte: www.google.com/images?Toxoplasma.gondii.com.br

O *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório capaz de invadir qualquer tipo de célula, exceto hemácias, no organismo dos seus hospedeiros (homens ou animais) para se multiplicar. O sucesso deste parasito como patógeno é atribuído à sua capacidade de invadir, residir e multiplicar-se dentro da célula hospedeira, com a formação do vacúolo parasitóforo (**Fig. 2**), no qual se reproduz assexuadamente por endodiogenia (processo de multiplicação assexuada), produzindo aproximadamente 2^{11} (HOFF & CARRUTHERS, 2002).

As principais estruturas envolvidas na penetração da célula do hospedeiro apresentam-se no complexo apical do parasito. O parasito adere a célula pelos de receptores de superfície (SAG) e orienta seu complexo apical de forma a criar uma junção intracelular e, formar na célula um vacúolo confortável que o protege contra radicais livres, variações de pH, flutuações osmóticas e contato com anticorpos, evitando assim, os mecanismos de defesa do hospedeiro (HUYNH et al., 2003). Esta forma de invasão expõe o mínimo de antígenos, o que dificulta o reconhecimento da resposta imune (HIRAMOTO et al., 2001).

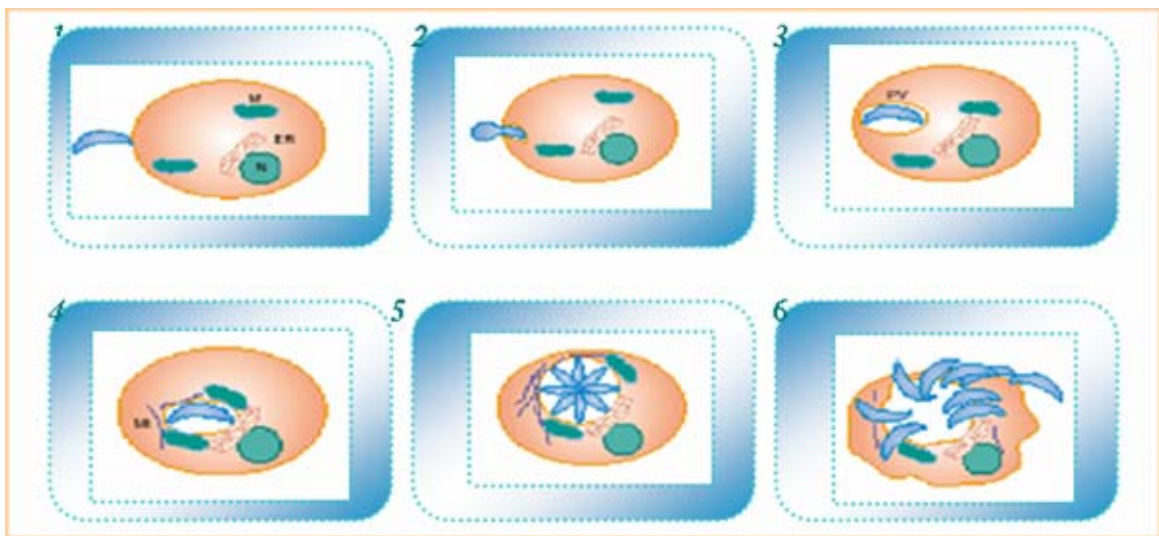


Figura 2: Invasão e replicação do taquizoito na célula hospedeira. 1- Adesão da parte anterior do parasita (Complexo apical) à membrana celular, 2- invaginação da membrana celular, 3- formação do vacúolo parasitóforo, 4-5- Multiplicação do parasita, 6- saída do parasita e morte celular.

Fonte: *TRENDS in Parasitology* 18 (6), 2002).

2.2. MORFOLOGIA DO PARASITO

O *T. gondii* apresenta como principais formas evolutivas ao longo de seu ciclo (**Fig. 3**) a: taquizoítos (forma proliferativa), b: bradizoítos (forma cística) e c: oocistos, o qual contém esporozoítos (TENTER et al., 2000).

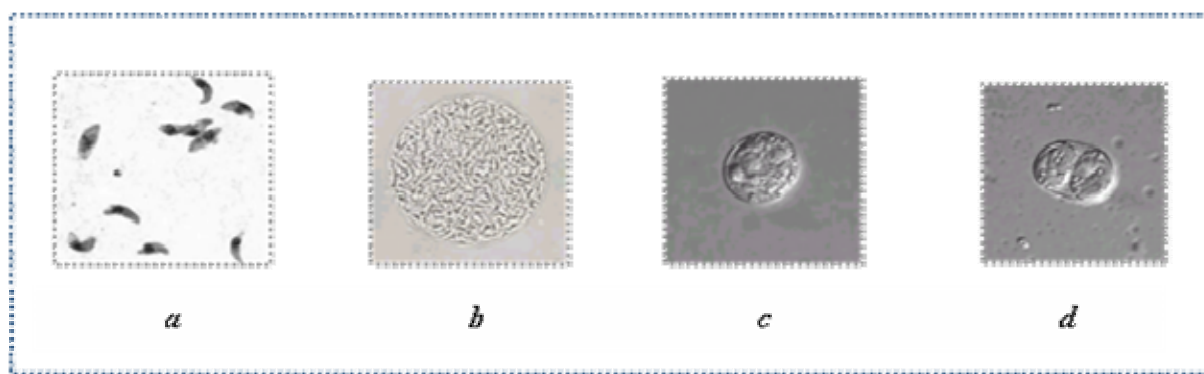


Figura 3: Principais formas evolutivas do *T.gondii*: **a:** taquizoítoitas, **b:** bradizoítoitas, **c:** oocisto imaturo e **d:** oocisto maduro, contendo dois esporoblastos, apresentando quatro esporozoítos. Fonte: www.cdc.gov e www.icb.ufmg.br.

Os taquizoítos (2-4 x 5-8 μ m) têm forma alongada em crescente ou ovalada. Multiplica-se por um tipo particular de divisão binária (endodiogenia), em todos os tipos de células do hospedeiro (**Fig. 3a**), exceto nas hemácias (COUTINHO & VERGARA, 2005).

Os bradizoítos apresentam estrutura análoga à dos taquizoítos, diferindo quanto às moléculas estágio-específicas em sua membrana, enzimas e proteínas de choque térmico. Outra diferença essencial é a resistência dos bradizoítos à digestão por ácido-pepsina (LYONS et al., 2002). Na célula parasitada eles se dividem lentamente em vacúolos parasitóforos, levando à perda completa da estrutura da célula do hospedeiro, originando cistos de paredes nítidas, contendo milhares de bradizoítos. O aparecimento dos cistos está relacionado a uma resposta efetiva, mas que não age sobre os bradizoítos no interior dos cistos (**Fig. 3b**) (COUTINHO & VERGARA, 2005).

Os oocistos (10x12µm) têm forma arredondada, sendo encontrados nas fezes dos gatos, ainda imaturos, aos milhares durante a fase aguda da infecção que têm permanência, em geral, de uma a três semanas (**Fig. 3c**). Após cerca de quatro dias no solo tornam-se maduros, por um processo chamado esporogonia, passando a conter dois esporocistos, cada um deles com quatro esporozoítos (**Fig. 3d**). Os oocistos maduros são infectantes quando ingeridos pelo próprio gato e por outros animais, inclusive o homem. (KAWAZOE., 2005).

O filo Apicomplexa apresenta além do *T. gondii* outras espécies de patógenos de interesse, como o *Plasmodium* (agente da malária), *Cryptosporidium spp* (agente da Cryptosporidiose), e *Eimeria* (agente das coccidioses em animais). Todavia, para o estudo dos aspectos biológicos do filo, o *T. gondii* aparece como importante modelo (SINAI et al., 1997) para a taxonomia, e o mais acessível para manipulação experimental. Em termos de ultra-estrutura do parasito, tanto os taquizoítos como bradizoítos e esporozoítos apresentam um complexo apical típico do filo constituído de conóide e rôptrias que são importantes no mecanismo de penetração das células do hospedeiro.

2.3. O CICLO BIOLÓGICO

O gato e outros felinos, principalmente os mais jovens, são os únicos animais em que o *T. gondii* desenvolve o ciclo sexuado (gametogônico), nas células epiteliais do intestino delgado através de multiplicação por endodiogenia e merogonia. A grande quantidade de taquizoítos no vacúolo parasitóforo e sua intensa mobilidade fazem com que haja uma ruptura inicial do vacúolo e posterior da célula, colocando em liberdade o parasito (merozoítos) para um novo processo de invasão nas células intestinais e transformação em gametócitos (microgametas e macrogametas). Os microgametas fertilizam os macrogametas e formam o zigoto ou ovo, que evolui formando uma parede dupla e origina o oocisto (KAWAZOE, 2005; COUTINHO & VERGARA, 2005). O oocisto que saem nas fezes apresenta-se imaturos, no ambiente, sofrem esporulação (tornando-se infectante) resultando na forma final de resistência (REY, 2002; HOFF & CARRUTHERS, 2002). Nestes animais também desenvolve o ciclo assexuado do parasito, com formação de cistos nos tecidos. O *Toxoplasma* representa um raro exemplo de parasito cujo ciclo assexuado pode continuar por carnivorismo, independentemente do ciclo sexuado (COUTINHO & VERGARA, 2005).

A Toxoplasmose é adquirida por humanos e outros hospedeiros intermediários (aves e mamíferos) através da ingestão oral de oocistos maduros, taquizoítos, e cistos (**Fig. 4**). Embora, os taquizoítos que chegam ao estômago são destruídos pelo suco gástrico, só sobrevivendo aqueles que penetram no organismo através da mucosa oral. Os oocistos e cistos ao passarem pelo estômago sofrem a ação do suco digestivo, liberando respectivamente esporozoítos e bradizoítos na luz do intestino, estes penetram no epitélio intestinal do hospedeiro e passam para estágio de taquizoítos. Desse modo inicia-se o ciclo assexuado do parasito levando a uma infecção sistêmica, onde ocorre o parasitismo em vários tecidos do

hospedeiro. E nos hospedeiros imunocomprometidos ou imune imaturos, uma infecção aguda disseminada (BARRAGEN & SIBLEY, 2002).



Figura 4. Ciclo do *Toxoplasma gondii* em ambos hospedeiros: completo (gato) e incompleto (aves, mamíferos e o homem).

Fonte: Ilustração de Maria da Conceição Gomes Leitão.

Quando um indivíduo é infectado pela primeira vez, não tendo ainda imunidade adquirida por infecção anterior, o parasito não encontra resistência específica do hospedeiro, podendo ter a fase de multiplicação rápida em suas células (endodiogenia), expandindo o parasitismo por via hematogênica, e originando a chamada fase aguda da infecção pelo *T. gondii*. Essa fase ocorre, na maioria das vezes de forma inaparente no hospedeiro humano imunocompetente, originando a toxoplasmose infecção. Menos frequentemente, pode originar a toxoplasmose doença, com sintomatologia em geral benigna. Vários tecidos podem estar infectados, incluindo muscular estriado e cardíaco, linfático, SNC, ocular e placentário (COUTINHO & VERGARA, 2005).

Com o surgimento da resposta imune adaptativa do hospedeiro, duas a três semanas após a primoinfecção, a fase de multiplicação rápida do parasito vai se extinguindo e, conseqüentemente, a fase aguda da infecção. O parasito passa a se multiplicar mais lentamente, passando para outro estágio, o bradizoíto. Este período é chamado fase latente ou crônica da Toxoplasmose, uma vez que os indivíduos estão inteiramente saudáveis, mas tendo cistos contendo parasitos viáveis em vários tecidos, principalmente no muscular estriado e cardíaco e no SNC. Todavia, a eventual ruptura de um cisto libera bradizoítos que, livres de resposta imune competente, podem se transforma novamente em taquizoítos gerando reagudização do processo (COUTINHO & VERGARA, 2005, KAWAZOE, 2005).

2.4. MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

A transmissão do *T.gondii* atinge além dos seres humanos vários animais como os herbívoros, os onívoros e carnívoros (REIMINGTON et al., 1985). A ampla distribuição mundial, diversidade de hospedeiros parasitados e das formas evolutivas infectantes do parasito resulta em várias rotas de transmissão (TENTER et al., 2000).

Vários indivíduos são infectados inadvertidamente, desta forma uma rota específica de transmissão não pode ser estabelecida. A variação da soroprevalência do *T. gondii* apresenta possível correlação com hábitos alimentares e de higiene da população. Isto reforça a confirmação da via oral como maior fonte de infecção (DESMONTS et al., 1965; REMINGTON et al., 2001). A transmissão vertical ocorre através dos taquizoítos, que são passados para o feto por via transplacentária (DUBEY et al., 1998). A transmissão horizontal do parasito pode envolver três estágios do seu ciclo de vida, oocistos esporulados, cistos teciduais e taquizoítos.

O oocisto, esporulado, é sugerido como a forma evolutiva, mais efetiva, de perpetuação do parasito entre os humanos, inclusive em vegetarianos, que não ingerem carne (REIMINGTON et al., 1994). Os oocistos constituem uma importante fonte de transmissão para animais herbívoros, roedores, aves; animais carnívoros e onívoros, que também podem se infectar oralmente. Acredita-se que a maioria das transmissões horizontais seja causada pela ingestão de cistos teciduais e oocistos em alimentos e água contaminados com fezes de felinos. (EDELHOFER et al., 1996; JANITSCHKE et al., 1999; DUBEY et al., 2000).

Nas Américas, acometimento recente da Toxoplasmose aguda em humanos tem sido associado a este tipo de contaminação do meio ambiente por oocistos (AMENDOEIRA, 2003; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

Os cistos de *T. gondii*, presente nos tecidos animais, representam uma importante forma de transmissão do parasito para animais carnívoros e onívoros, inclusive o homem. Os cistos já podem ser desenvolvidos por volta do sexto ou sétimo dia após a infecção, e provavelmente persiste por toda a vida do hospedeiro (DUBEY et al., 1998). Todavia, o número exato dos cistos que foram desenvolvidos no interior do hospedeiro e a localização destes, depende da espécie do hospedeiro parasitado (DUBEY et al., 2000; SHIRLEY et al., 1997; TENTER et al., 1999).

Os taquizoítos são os principais responsáveis pelos casos de transmissão vertical (congenita) do *T. gondii*. Os taquizoítos, presentes inclusive no sangue, podem originar transmissões intra-uterinas, causando danos ao embrião ou feto. Nos últimos anos o transplante de coração, rins, fígado e medula óssea, requereram uma maior prudência devido ao risco de infecção pelos cistos do parasito (DUBEY et al., 1989; HO-YEN et al., 1992). Os taquizoítos são transmitidos ainda, via produtos sanguíneos, em particular leucócitos, e através de injeção acidental em laboratório (HO-YEN et al., 1992; LUFT et al. 1989).

2.5. CEPAS DE *Toxoplasma gondii*

O *T.gondii* apresenta uma extraordinária estrutura populacional que consiste em três linhagens clonais predominantes denominadas I (Rh e GT-1), II [ME49 e outras derivadas (PSD, PLK PTg)] e III (CEP e VEG) (KHAN et al., 2005). Estas linhagens foram caracterizadas através de estudos genéticos e de isoenzimas expressas. As diferenças verificadas nas linhagens são provenientes do genótipo SAG2, quanto aos locais de ocorrência e à virulência (DARDÉ et al., 1997; SIBLEY & BOOTHORYD, 1992; HOME & SIBLEY, 1995; HOME et al. 1997).

As três linhagens têm ampla distribuição geográfica e pode infectar várias espécies de animais, inclusive o homem. Estudos realizados em camundongos apresentaram que as cepas do tipo I são altamente virulentas, enquanto as II e III são relativamente avirulentas (HOME & SIBLEY, 1995). As cepas predominantes em humano são as do tipo I e II e nos animais a tipo III, mais nestes ainda pode ser encontrada a tipo II (HOME & SIBLEY, 1995; DUBEY et al., 2002a).

As cepas do tipo I estão associadas aos casos mais graves de lesões oculares e a uma maior resistência à terapêutica (LEHMANN et al., 2000; GRIGG et al., 2001). Os pacientes com SIDA apresentam predominância da linhagem II, e os casos de infecção congênita as linhagens I e II (AIZENBERG et al., 2002).

Em Portugal, SOUSA et al., (2006) desenvolveu um estudo de caracterização molecular de isolados do *T. gondii* originados de 15 porcos, através de PCR, e verificou que 11 isolados do parasito foram do tipo II e em quatro do tipo III.

No Brasil, foram analisados isolados do parasito em 25 galinhas assintomáticas provenientes de áreas rurais em torno da cidade de São Paulo, e foi identificada a predominância da linhagem I, e em menor proporção da linhagem III (DUBEY et al., 2002b). Outros estudos de isolados do parasito em gatos do Pára apresentaram resultados similares da predominância das linhagens I e III, sugerindo que estas são as cepas mais freqüentes no Brasil.

2.6. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Em relação ao hospedeiro humano e outros animais, o *T. gondii* apresenta alta infecciosidade demonstrada pelos dados epidemiológicos (Fig. 5) da prevalência da infecção e, baixa patogenicidade se considerarmos a abrangência cosmopolita da infecção, em relação ao grande número de indivíduos assintomáticos, com infecção latente. Além da existência de numerosas cepas apresentando diferentes graus de virulência e com ampla distribuição mundial capazes de infectar populações humanas e outros animais (NETO et al., 2000).

A disparidade das taxas de infecção humana e em animais obtida em diferentes países deve-se a diferentes fatores como localização geográfica, condições ambientais, hábitos culturais dos povos. Principalmente no tocante a alimentação, tipo de fauna, grau de desenvolvimento do país e infra-estrutura hídrica e sanitária (REMYINGTON et al., 1995) e a própria metodologia utilizada nos inquéritos epidemiológicos.

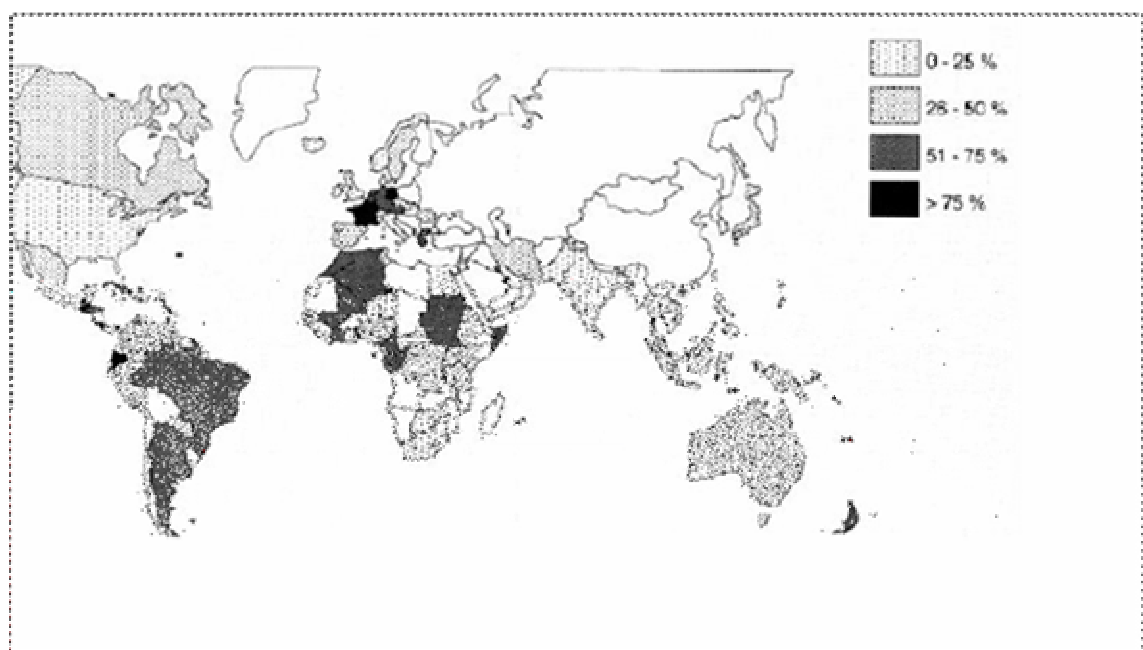


Figura 5. Prevalência Global da Toxoplasmose (1993).

Fonte: www.google.com.br/imagens/toxoplasmosis

As maiores prevalências da infecção são encontradas em regiões de climas quentes e húmidos, já as menores prevalências têm sido localizadas em regiões muito frias ou muito áridas, onde ocorre baixa densidade de felina e menor sobrevivência dos oocistos no solo (COUTINHO & VERGARA, 2005). Ressaltando a importância epidemiológica dos gatos na toxoplasmose, principalmente os mais jovens, com a primoinfecção, que eliminam milhões de oocistos no solo (FRENKEL et al., 1975).

Surtos epidêmicos de toxoplasmose têm sido descritos com certa frequência em várias regiões do mundo, sempre relacionados à presença de gatos (TEUTSCH et al., 1979; STAGNO et al., 1980) ou ingestão de carne mal cozida (KEAN et al., 1969), provavelmente combinação de ambos os fatores (MAGALDI et al., 1967; COUTINHO et al., 1982). A presença de gatos e roedores em cerca de 90% das propriedades de criação de suínos (ARAÚJO et al., 2000) na região de Erechim no Rio Grande do Sul, tem sido responsável pela elevada prevalência da doença, incluindo casos de retinocoroidites (GLASNER et al., 1992). O Norte do Rio de Janeiro também apresenta alta endemicidade, isto devida à possibilidade da água consumida pela população está poluída por fezes de gatos, sendo apontada como fonte de infecção (BAHIA-OLIVEIRA, 2003).

Em animais para comercialização de carne, a prevalência do *T. gondii* é mais freqüente em ovelhas, porco e cabras e menos freqüente aves domésticas, coelhos, cães e cavalos. Estudos recentes apresentaram que a prevalência do *T. gondii* em carne animal decresceu consideravelmente nos últimos 20 anos nas áreas com supervisão intensiva. Como na União Européia onde a carne de porco vendida em mercados tem sofrido um declínio da prevalência do parasito para 0.58%. Todavia, os porcos isolados de pequenos criadouros são ainda vendidos a preços reduzidos para consumo humano e a prevalência do parasito nestes animais pode ser de até 93% (DUBEY et al., 2002a; VAN KNAPEN et al., 1995;

EDELHOFER et al., 1996). No Brasil, desde e 1992 até o ano de 1998 a prevalência do *T. gondii* em porcos decresceu em 30% (TENTER et al., 2000). Em São Paulo, Minardi et al. (2003) detectaram 14,5% de caprinos soropositivos.

A toxoplasmose em humanos, apresenta prevalência entre 20 e 90% na população adulta (CARMO et al., 2005; MEEK et al., 2000). Na América Latina 50 a 70% dos indivíduos são soropositivos (WALTON, 1971) e estas taxas são similares às encontradas na França, provavelmente, pelo hábito dos franceses de consumir carne crua ou mal cozida. No Brasil 50 a 80% dos adultos são soros positivos (ORÉFICE & BONFIOLI, 2000). Em Pernambuco a taxa de prevalência em adultos é cerca de 75% (COELHO et al., 2003), e em crianças (na faixa etária de 9 a 15 anos) é de 79,1% (KOBAYASHI et al., 2002). Inquéritos sorológicos, realizados nas cidades de Belo Horizonte, São Paulo e Rio de Janeiro, apresentaram as respectivas prevalências 50,3%, 54,8% e 78,7% (ARAÚJO, 1970; CAMARGO et al., 1976; COUTINHO et al., 1981). Estudos realizados em tribos indígenas demonstram elevadas taxas de infecção pelo *T. gondii*. (BARUZZI, 1970; AMENDOEIRA et al., 2003).

Estudos desenvolvidos por FRENKEL & RUIZ (1981) sugerem as crianças são infectadas na primeira década de vida, ou seja, que as proporções de soropositivos para o *T. gondii* crescem com a idade, atingindo os patamares dos adultos no final da puberdade. Resultados semelhantes foram apresentados no Rio de Janeiro.

A Toxoplasmose congênita apresenta-se em 90% dos casos de forma assintomática ou Oligossintomática (WONG et al., 1994). Nos Estados Unidos da América e na Europa as taxas de infecção congênita atingem de um a dois nascidos para cada 1.000 nascimentos (LEBECH et al., 1999).

Na França o risco de transmissão para ao feto tem sido maior, estimando-se 10 casos dentre 1.000 gestações (NÓBREGA et al., 2002), enquanto no Rio de Janeiro foram encontrados quatro casos entre 1.034 nascidos vivos (COUTINHO et al., 1981). No Brasil, estudos sorológicos em grávidas apresentaram soropositividade (IgG) de 77% no Rio de Janeiro e 69,4% em Pernambuco. Estudos realizados na Bahia apresentaram resultados semelhantes com taxa de 64,92% de gestantes soropositivas (MEIRELES FILHO, 1985; NÓBREGA et al., 2002).

A toxoplasmose ocular apresenta como manifestação ocular mais importante a retinocoroidite, que pode vir acompanhada de outras alterações oculares (GLASNER et al., 1992; MONTOYA & REMINGTON, 1996). No Brasil, cerca de 50 a 80% das uveítes têm como origem etiológica o *T.gondii* (LYNCH et al., 2004; ABREU et al., 1987; TENTER et al., 2000).

Um outro grupo de grande importância epidemiológica são os indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), nos quais a neurotoxoplasmose permanece como uma das principais causas da encefalite confocal. A doença provém, na maioria dos casos, de reativação de infecção latente e apresenta uma prevalência de 3% a 50%, de acordo com a área geográfica (BORGES & FIGUEIREDO, 2004; BERTOLI et al., 1995; DUNLOP et al., 1996).

3.1. Toxoplasmose em humanos

A toxoplasmose humana, enquanto doença, pode apresentar os seguintes aspectos clínicos: adquirida em indivíduos imunocompetentes (onde geralmente se estabelece como síndrome semelhante a mononucleose), adquirida ou reativa em indivíduos imunodeprimidos, ocular (que pode ser tanto de origem congênita como adquirida) e congênita (NETO et al., 1995; REIMINGTON et al., 1995).

3.1.1 Toxoplasmose pós-natal no paciente imunocompetente

Nos indivíduos imunocompetentes a doença, geralmente, tem um curso benigno e auto limitado podendo apresentar-se assintomática ou ologossintomática. Segundo relatos, somente de 10% a 20% dos indivíduos infectados pelo *T. gondii* apresentam sintomas da doença, caracterizando a alta infectividade e baixa patogenicidade do parasito (FRENKEL, 1988; BEARMAN, 1995).

A toxoplasmose pós-natal, na fase aguda, apresenta como manifestação clínica mais freqüente a linfadenomegalia (geralmente cervical). Em alguns casos mais graves a linfadenomegalia pode vir acompanhada de hepatoesplenomegalia, como também pode apresentar exantema máculo-papular (**Fig. 6**). Com exceção do acometimento ocular, a evolução clínica da toxoplasmose é favorável (FRENKEL, 1991; HINRICHSSEN et al., 2001).



Figura 6: Exantema maculo-papular por *T. gondii*.
Fonte: Universidade de Erlangen/ Dptº de dermatologia.

3.1.2 Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular pode ter origem congênita ou ser adquirida após o nascimento, e pode ser resultante de uma infecção aguda ou reincidente, apresentando manifestações clínicas precoces ou tardias, (MONTROYA et al., 1996; HOLLAND et al.,1996). A lesão mais frequentemente ocasionada pela toxoplasmose é a retinocoroidite granulomatosa necrotizante (**Fig.7**), decorrente do tropismo que o *T. gondii* tem pela retina.

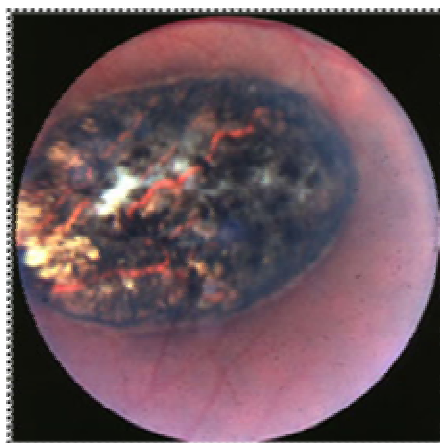


Figura 7: Retinocoroidite por *T.gondii*
Fonte: Lynch, 2004

A Toxoplasmose também é a causa mais freqüente de uveíte posterior em diferentes partes do mundo. Nos EUA e na Europa estima-se esta lesão está presente em cerca dos 35% casos de uveíte posterior, tendo como agente etiológico o *T. gondii* (CARMO et al., 2005).

No Brasil a toxoplasmose ocular representa cerca de 50 – 80% do total das uveítes SAFADI, (2000); LYNCH et al., (2004); PORTELA et al. (2004) estudaram uma população em Minas Gerais, na qual 12,5% dos indivíduos infectados pelo *T. gondii* desenvolveram lesões oculares, sendo a maioria dos deles com idade superior a 50 anos.

A região sul do Brasil é a mais afetada pela forma ocular da Toxoplasmose. Estudos epidemiológicos realizados na população de Erechim (Rio Grande do Sul), indicaram uma prevalência de 95% da toxoplasmose na população, ainda, dentre estes 20% apresentaram toxoplasmose ocular. Segundo os autores esta prevalência é 30 vezes mais alta do que as observadas em outras regiões do mundo.

3.1.3 Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita é considerada importante causa mundial de morbidade e mortalidade infantil. A infecção transplacentária pode ocorrer quando a gestante imunocompetente adquire a primoinfecção, em qualquer momento da gestação ou mesmo algumas semanas antes do seu início, apresentando infecção aguda, ou ainda, em gestantes imunocomprometidas, nas quais pode ocorrer uma reativação da infecção, latente (COUTINHO & VERGARA, 2005).

Trabalhos desenvolvidos por HOHLDFELD et al., (1994) e DUNN et al., (1999) tem demonstrado que o risco da transmissão da infecção para o feto é menor no primeiro trimestre da gestação, cerca de 10 a 20%, aumentando com a idade gestacional, no último trimestre pode chegar à cerca de 60% a 70%. Contrariamente, o risco de maiores danos para o feto

ocorre no primeiro e segundo trimestres, levando a morte do embrião ou do feto e aborto espontâneo, ou seqüelas graves da infecção aguda intra-uterina como calcificações intracranianas, microcefalia, macrocefalia (**Fig. 8**) em virtude da hidrocefalia e dilatação dos ventrículos (COUTINHO & VERGARA, 2005).

Os recém-natos, mesmo se infectados, apresentam-se geralmente normais, embora havendo necessidade de acompanhamento clínico e laboratorial. Isto devido, a probabilidade de virem a apresentar seqüelas na primeira ou segunda década de vida, sendo a retinocoroidite de maior ocorrência (BOSCH-DRIESSEN, 2002).



Figura 8: Macrocefalia e dano visual.
Fonte: [www. google.com.br](http://www.google.com.br) – Dr. V. Rhein.

Todavia, em uma minoria de casos os sinais clínicos da toxoplasmose no recém-nato são aparentes, às vezes com evidências de doença aguda apresentando febre ou hipotermia, hepatoesplenomegalia, petéquias, erupções cutâneas, encefalite, pneumunite, diarréia e anemia. No caso do aparecimento de tais evidências deve-se realizar um diagnóstico diferencial de outras doenças infecciosas comuns a recém-natos, como rubéola, citomegalovírus, sífilis e o vírus da herpes simples (COUTINHO & VERGARA, 2005).

Em virtude das várias manifestações clínicas provenientes toxoplasmose congênita, e que acometem os recém-natos. Recomenda-se sempre pensar no diagnóstico, uma vez que, se confirmado a terapêutica específica pode melhorar em muito o prognóstico e diminuir a incidência de seqüelas posteriores. Em alguns países, como França e Áustria a pesquisa sorológica pré-natal, é, por lei, obrigatória. Tal procedimento reduziu a incidência da Toxoplasmose fetal de 40% para 7%. No entanto, no Brasil tal procedimento não é realizado e aproximadamente 30% das gestantes possuem sorologia negativa para Toxoplasmose, estando estas, sob o risco de contaminação (NÓBREGA et al., 1999; SPALDING et al., 2003; DUTRA LEÃO et al., 2004).

3.1.4 Toxoplasmose no imunocomprometido

A Toxoplasmose apresenta uma ampla distribuição mundial, por conseguinte a reativação desta em indivíduos imunocomprometidos é um evento freqüente, devido a apresentarem a imunidade deprimida. Frequentemente a evolução da doença é para forma grave e até mesmo letal (ISRAELSKI & REIMINGTON, 1993). Os grupos que apresentam um elevado risco de desenvolver a toxoplasmose são: os portadores de neoplasias hematológicas (portadores de linfomas), transplantados de medula óssea e receptores de transplante de órgãos sólidos e indivíduos com SIDA.

A infecção nos transplantados cardíacos e outros imunocomprometidos, soronegativos para *T. gondii* é adquirida a partir do órgão recebido (LUFT et al., 1983. 1986). A encefalite é a manifestação mais comum nestes indivíduos (ISRAELSKI & REIMINGTON, 1993). A neurotoxoplasmose permanece com uma das principais causas de encefalite focal em pacientes com SIDA e ocorre em aproximadamente em um terço destes casos, variando o número de caso com a soro prevalência da região (GRANT et al., 1990).

Segundo dados do ministério da saúde relativos aos anos de 1980 a 2000, de um total de 893.691 doenças notificadas no período 3% delas eram casos de neurotoxoplasmose associados à SIDA. O risco estimado da reativação da toxoplasmose em pacientes com SIDA, atingindo o sistema nervoso central (SNC) varia de 12% a 47% (BORGES et al., 2004). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, a Toxoplasmose chega a 15,4% das principais doenças oportunistas que afeta este grupo de risco e quando não diagnosticada e tratada cedo tem curso clínico fatal (FERREIRA E BORGES, 2002). Vários trabalhos demonstram a preferência da reativação da infecção crônica pelo *T. gondii* no SNC (Revisto por FERREIRA & BORGES 2002). As hipóteses para este fato são: baixa imunidade local, déficit dos mecanismos que inibem a multiplicação do parasito, como anticorpos específicos e interferon- γ , que não atravessam a barreira hematoencefálica, e maior facilidade de penetração do parasito no cérebro (AMBROISE-THOMAS & PELLOUX, 1993; MONTOYA & REIMINGTON, 1997).

Nos indivíduos imunocomprometidos, o prognóstico de risco de encefalite pelo *T. gondii* incluem perfil sorológico, grau de imunossupressão e quimioprofilaxia (GRANT et la., 1990). Nos pacientes com SIDA, mais de 95% das encefalites toxoplásmicas são relacionadas á reativação do foco primário, e mais de 90% destes pacientes têm o número de linfócitos TCD4+ inferior a 100 células/mm³ (LUFT & REIMINGTON, 1988; PORTER & SANDE, 1992). Em presença de sorologia positiva pacientes com níveis de linfócitos TCD4+ inferior a 200 células/mm³ e que não fazem quimioprofilaxia com sulfametoxazol-trimetoprima, tem um risco aproximado de 35% de desenvolver neurotoxoplasmose em dois anos Sendo assim, o perfil sorológico deve fazer parte dos exames iniciais de todos os imunocomprometidos (CLOUGH et al., 1997).

4. DIAGNOSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da toxoplasmose apesar de possuir um amplo e diversificado suporte de ferramentas diagnósticas, ainda é uma incógnita em várias situações. Nos indivíduos imunocompetentes, via de regra, a infecção pelo *T. gondii* assume caráter benigno, evoluindo para a fase latente (crônica) da infecção, assintomática. Todavia, comumente, até mesmo a fase aguda, nestes indivíduos mantém níveis subclínicos, oligossintomáticos, apresentando manifestações comuns a outras etiologias (CAMARGO, 2001; COUTINHO & VERGARA, 2005).

O diagnóstico da toxoplasmose apresenta-se complexo e em contínua evolução, a resposta mais esperada no diagnóstico da toxoplasmose é datar a infecção, ou seja, distinguir entre infecção latente (comum na população) e infecção recente, e ressaltam-se duas situações em que a identificação do período da infecção, é imprescindível, devido a gravidade e irreversibilidade das lesões que podem ser causadas pelo *T. gondii*: nas gestantes, devido ao risco da transmissão materno-fetal e nos indivíduos imunocomprometidos, devido a estes estarem em constante risco de reativação da infecção, ou mesmo de reinfecção por queda da imunidade (COUTINHO & VERGARA, 2005; CAMARGO, 2001; MONTROYA, 2004).

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito, e na evidenciação do DNA parasitário pela PCR. Outros métodos são baseados na demonstração direta do parasito (taquizoítos e/ou cistos) em material biológico.

4.1 Os exames sorológicos

A reação de SABIN FELDMAN (1948) ou teste do corante foi o teste pioneiro para detecção de anticorpos contra *T. gondii*, mais devido à utilização de parasitos vivos como antígeno que aumentam o risco do operador, foi substituído pelo Teste da imunofluorescência indireta que além de mais prático fornece resultados comparáveis. Além desse teste, o diagnóstico da toxoplasmose, atualmente, é realizado por reações de Hemaglutinação indireta, reação Imunoenzimática (ELISA) e imuno-marcação em proteínas isoladas em membranas ou Immunoblotting. (CAMARGO, 1996).

Para a determinação do período de ocorrência da fase aguda da infecção se faz necessário mais de um tipo de teste sorológico. As primeiras informações são obtidas através da pesquisa dos anticorpos específicos contra o *T. gondii* nas classes IgG e IgM (COUTINHO & VERGARA, 2005). E estas informações são complementadas através da pesquisa das imunoglobulinas IgA e IgE, que vem a auxiliar e por vezes confirmar, em alguns casos, o período da infecção.

4.1.1 A Imunoglobulina G (IgG)

Os testes mais utilizados para a pesquisa de anticorpos IgG são ELISA, Imunofluorescência indireta e Hemaglutinação indireta. Estes anticorpos surgem no soro geralmente durante segunda semana pós-primo infecção, os níveis máximos são atingidos no primeiro ou segundo mês, declinando daí por diante, mais permanecendo presente em níveis baixos para o resto da vida. O IgG é considerado marcador de fase crônica e anticorpo de memória (**Fig. 8**). Os indivíduos com reativação da infecção apresentam elevação dos títulos de IgG. (COUTINHO & VERGARA, 2005; CARVALHO E FARHAT, 1999; COUTO et al., 2002).

4.1.2 A Imunoglobulina M (IgM)

A detecção dos anticorpos IgM é realizada através de ELISA de imunocaptura, o ensaio *immunsorbent* IgM (IgM-ISAGA) e hemaglutinação reversa (COUTINHO & VERGARA, 2005). O desenvolvimento de técnicas de captura possibilitou eliminar os resultados falsos positivos, no entanto tais metodologias detectam a presença da IgM um ano ou mais após a infecção, podendo levar a interpretações errôneas (CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002). Os anticorpos IgM surgem ainda na primeira semana de infecção, atingem o pico no final do segundo mês, declinando após o sexto mês, mas ainda permanecem na circulação após doze meses do início da infecção (**Fig. 9**).

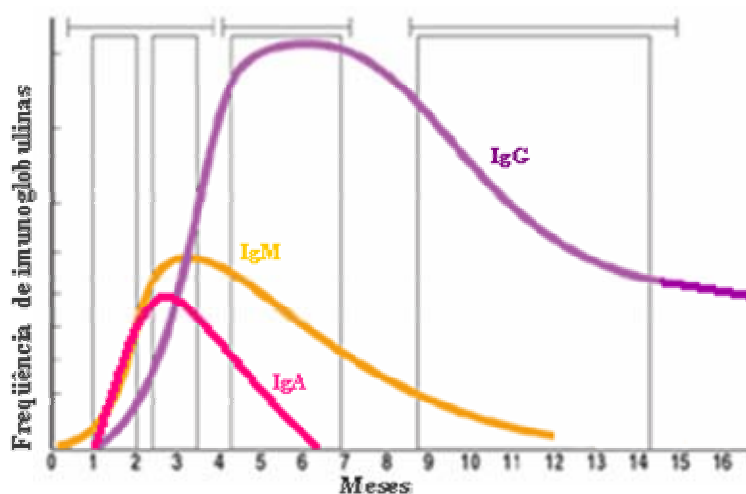


Figura 9. Frequência dos anticorpos, no curso da primo-infecção pelo *T. gondii*.
Fonte: www.google/imagem/toxoplasmosis.com.br

4.1.3 As Imunoglobulinas A (IgA) e E (IgE)

As técnicas mais utilizadas para detecção dos anticorpos IgA e IgE são as imunoenzimáticas, tanto indireta como a de captura. Nos Estados Unidos da América e Europa os testes ELISA ou ISAGA têm sido utilizados para detecção da IgA como indicativo de fase aguda, no Brasil, a frequência de utilização destes ainda é baixa (**Fig. 8**). Os anticorpos IgA se elevam quase ao simultaneamente a anticorpos IgM, entretanto,

desaparecem da circulação em 6 a 7 meses após a infecção, sendo considerado um bom marcador de fase aguda (AMENDOEIRA, 2001). Nos dois primeiros meses após a infecção o anticorpo IgE pode ser observado, em altas concentrações, declinando rapidamente até não ser mais detectada após 4 meses, apresentando uma produção mais curta que a IgM e IgA (AMENDOEIRA, 2001; COUTO et al., 2002).

4.1.4 Avidéz de IgG

Na busca de um diagnóstico mais preciso para identificação da infecção em passado distante ou recente, foi introduzido o teste de avidéz de IgG (HEDMAN et al., 1989). Este teste apresenta o formato ELISA e, determina a avidéz dos anticorpos IgG para os antígenos do *T. gondii*. O teste utiliza uréia ou outro agente desnaturante para dissociar o complexo antígeno anticorpo e o grau de dissociação é inversamente proporcional à avidéz do anticorpo. Um teste demonstrando baixa avidéz de IgG reflete infecção recente ou atual, embora a avidéz possa permanecer baixa além de três meses da primoinfecção (MONTROYA et al., 2002; MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Por outro lado, uma alta avidéz de IgG sugere primoinfecção passada, de quatro a cinco meses atrás (REIMINGTON et al., 2004). Além do teste de avidéz da IgG devem-se realizar outros testes para anticorpos IgG e IgM, devido a este teste poder apresentar resultados duvidosos, nos limites entre a alta e baixa avidéz.

4.1.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

O parasito pode ser identificado pela detecção de segmentos característicos de seus ácidos nucleicos, depois da ampliados pela reação em cadeia de polimerase. A PCR tem sido utilizada no diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, usando o líquido amniótico, da toxoplasmose ocular pelo exame do humor vítreo ou aquoso e, da toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos no caso de envolvimento de sistema nervoso central ou da forma disseminada. Todavia, é um método dispendioso e que exige controles rigorosos para evitar

resultados falso positivos como salas e equipamentos separados, controles negativos e positivos devem estar presentes em todos os testes para detectar, respectivamente, contaminação por DNA ou inibição da reação. Além disso, é importante repetir o teste principalmente quando o resultado for positivo (FERREIRA et al., 2002; COUTINHO & VERGARA, 2005).

4.1.6 Isolamento e demonstração do parasito

O isolamento do *T. gondii* pode ser feito a partir de material biológico infectado como esfregaços de lavado brônquico, liquor cefalorraquidiano e inoculação em camundongos ou em cultura de células *in vitro*. A demonstração do parasito através da histopatologia utilizando técnicas convencionais é sempre difícil, mais quando positivo define a fase aguda da infecção (COUTINHO & VERGARA, 2005).

4.2 Diagnóstico laboratorial no paciente imunocompetente

A Toxoplasmose apresenta-se na grande maioria dos casos de forma assintomática, devido a isto, os exames laboratoriais para diagnosticar esta parasitose não são rotineiros, a não ser nos poucos casos, em que a forma linfoganglionar se estenda por mais tempo, ou nos raros casos da doença mais grave, em que pode haver comprometimento do miocárdio ou de outros tecidos (COUTINHO & VERGARA 2005).

Na presença de quadro clínico indicativo da toxoplasmose os primeiros testes para detecção da fase aguda (recente ou atual) são de pesquisa dos anticorpos IgG e IgM. Quando os anticorpos IgG apresentam níveis baixos e os anticorpos IgM estão ausentes, afasta-se o diagnóstico de fase aguda. Este é um quadro típico apresentado pela maioria da população adulta, que já teve a primo-infecção na infância (**Fig. 10**). O indicativo de fase aguda recente ou atual da primo-infecção é a presença dos anticorpos IgG e IgM. Entretanto, seria

necessário um exame confirmatório, da baixa avidéz de IgG, para uma maior segurança deste diagnóstico. Há casos raros, em que um exame realizado nas duas primeiras semanas após a infecção, apresente o teste para IgG ainda negativo e o teste para IgM positivo. Neste caso, o procedimento correto seria a realização de novos exames, uma a duas semanas após, para verificar a soroconversão dos anticorpos IgG, e verificar a baixa avidéz destes, para um diagnóstico de fase aguda (COUTINHO & VERGARA, 2005).

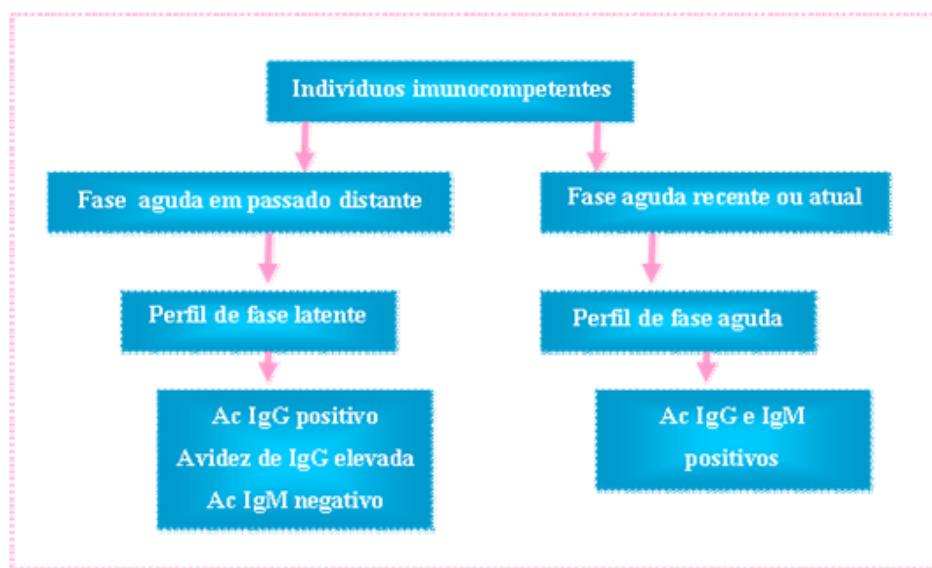


Figura 10. Síntese do diagnóstico laboratorial em indivíduos imunocompetente.
Fonte: COUTINHO & VERGARA, 2005.

4.3 Diagnóstico laboratorial da retinocoroidite

Na grande maioria das vezes, o diagnóstico da Toxoplasmose ocular (**Fig 11**) é realizado inicialmente pelo oftalmologista, pela identificação de lesão com aspectos clínicos típicos, lesão ativa branco-amarelada com cicatriz pigmentada e perivasculite. Entretanto, esta lesão pode ser ocasionada por outros agentes etiológicos além do *T. gondii*, e mesmo assim, conduzir ao mesmo aspecto clínico. Nestes casos o diagnóstico laboratorial vem auxiliar no diagnóstico diferencial de tais lesões (LYNCH et al, 2004).

Os testes sorológicos são, no momento, a principal ferramenta laboratorial no diagnóstico da toxoplasmose, entretanto, os mesmos, apresentam a dificuldade em discriminar entre toxoplasmose ativa (aguda ou reativa) da crônica (latente). Devido à gravidade e irreversibilidade das lesões oculares causadas pelo *T. gondii*, o diagnóstico precoce dessa infecção é de fundamental importância para que seja possível aplicar a intervenção terapêutica no momento adequado (ASAI et al., 1996; LEITÃO et al., 2003).

O anticorpo IgA vem sendo apontado como um importante marcador de fase aguda da toxoplasmose, devido a apresentar níveis elevados, em todos os casos de Toxoplasmose Sistêmica Aguda e Congênita. Os anticorpos IgA se elevam quase simultaneamente aos anticorpos IgM, entretanto, são negativos com 6 a 8 meses após a infecção, sendo considerado marcador de fase aguda (ABREU et al., 1987). Em alguns estudos realizados em indivíduos com Toxoplasmose ocular a IgA sérica vem sendo sugerida como um bom marcador de fase ativa, apresentando uma elevação dos níveis em indivíduos com UPAPT (LEITÃO et al., 2003).

A baixa avidéz da IgG no humor aquoso, constitui um bom marcador, em contraste com alta avidéz no soro (CAMARGO, 2001), a detecção de IgA ocular também tem sido estudada como um bom marcador. LYNCH et al (2004) relataram uma forte associação entre a doença e a produção lacrimal de IgA, demonstrando essa imunoglobulina ser um auxílio no diagnóstico da Toxoplasmose Ocular. Pesquisas para detecção do DNA do parasita, também estão sendo avaliadas com a técnica de PCR (CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

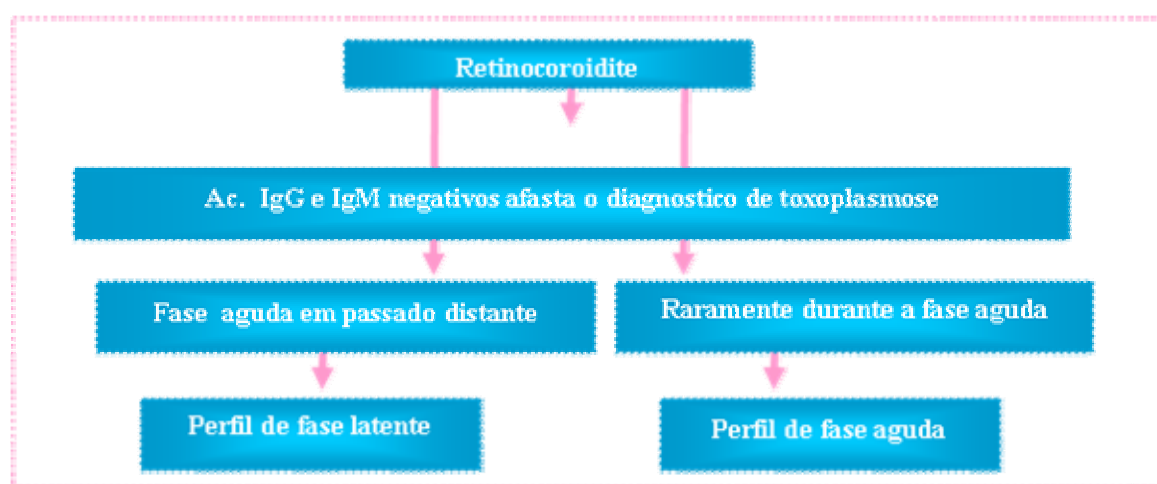


Figura 11. Síntese do diagnóstico laboratorial da retinocoroidite.
Fonte: COUTINHO & VERGARA, 2005.

4.4 Diagnóstico laboratorial no imunocomprometido

Nos imunocomprometidos, os exames sorológicos para detecção de anticorpos específicos têm pouco valor (devido a estes apresentarem um perfil sorológico anômalo), a não ser para levantar suspeita de reativação de foco latente de *T. gondii* em imunocomprometidos que já apresentaram testes para anticorpos IgG positivos, e sinais de comprometimento neurológico. Nestes casos de reativação, as taxas de IgG, às vezes, podem aumentar. Já os anticorpos IgM, são inesperados, embora possam ocorrer (**Fig 12**). A ausência de testes sorológicos positivos não afasta o diagnóstico. Assim, em imunocomprometidos outros métodos diagnósticos se fazem necessário (COUTINHO & VERGARA, 2005).

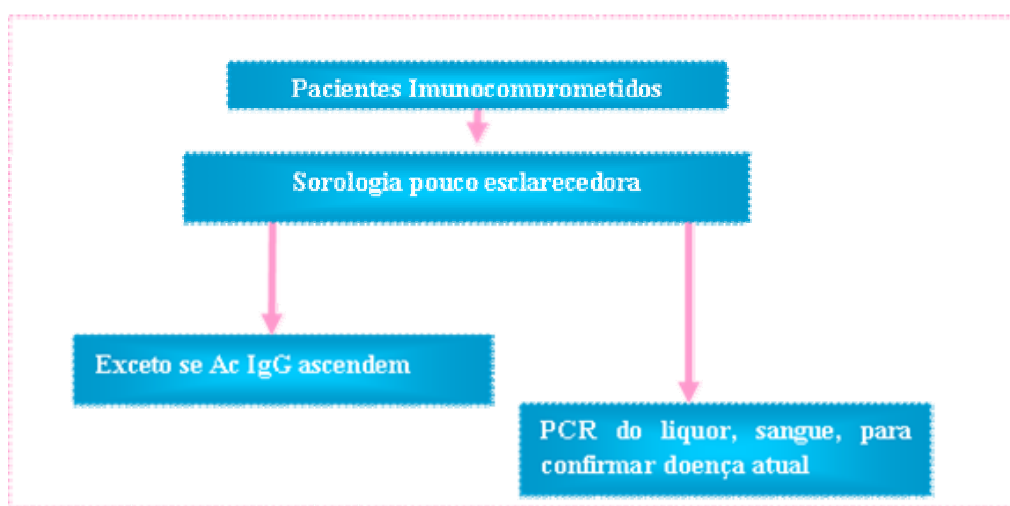


Figura 12. Símula do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos.
Fonte: COUTINHO & VERGARA, 2005.

O diagnóstico precoce de neurotoxoplasmose em HIV tem sido limitado devido à falta de testes não invasivos de alta sensibilidade e especificidade (Ferreira e Borges, 2002). O PCR pode ser positivo nos casos de comprometimento imunológico do sistema nervoso central, e o exame de liquor é normal em 20 a 30% dos casos (FERREIRA & BORGES, 2002; MONTROYA, 2002). O diagnóstico definitivo se faz por biópsia e identificação do

parasito por técnicas como imunoperoxidase em fragmentos de tecido. Os estudos de imagem devem ser considerados mesmo na ausência de déficits focais.

O diagnóstico presuntivo pode ser feito por tomografia computadorizada (TC) ou ressonância nuclear magnética (RNM). Em geral, as lesões são múltiplas, mais podem ser isoladas (NAVIA et al., 1986; DINA, 1991). Quando os testes sorológicos são negativos para *T. gondii* e os exames de imagem não levantam suspeita suficiente para iniciar a terapêutica, é indicada a punção lombar e os exames completos do líquido, que inclua técnicas de PCR específicas para o parasito (COUTINHO & VERGARA, 2005).

4.5 Diagnóstico laboratorial na gravidez

Os testes sorológicos devem ser feitos, por toda mulher que planeja engravidar ou já gestante. Um teste apresentando taxas baixas de IgG e, IgM negativo é indicativo de uma gravidez destituída de risco, para gestantes imunocompetentes (**Fig 13**). No caso de teste apresentando anticorpos IgM positivos, pode significar infecção recente e portanto a possibilidade de transmissão materno-fetal. Neste caso, para confirmação, outros exames são necessários, devido a possibilidade de ocorrência de teste IgM falso positivo e também da permanência deste por mais de um ano após a primo-infecção, o que pode levar a um falso diagnóstico de infecção recente (GRAS et al., 2004).

Para confirmação do diagnóstico de infecção recente, deve ser utilizado o teste de avididade de IgG, assim como, repetir os testes IgG e IgM, cerca de duas semanas após o primeiro teste. O teste confirmatório pela avididade de IgG tem a vantagem de poder ser realizado juntamente com os primeiros testes, ou imediatamente após se tomar conhecimento de um resultado IgM positivo. Segundo REMINGTON et al (2004), o resultado do teste de avididade de IgG pode variar segundo sua melhor aplicação, no primeiro trimestre da gestação,

permitindo afastar possível ocorrência de primo-infecção nos últimos quatro a cinco meses, no caso do teste apresentar alta avidez.

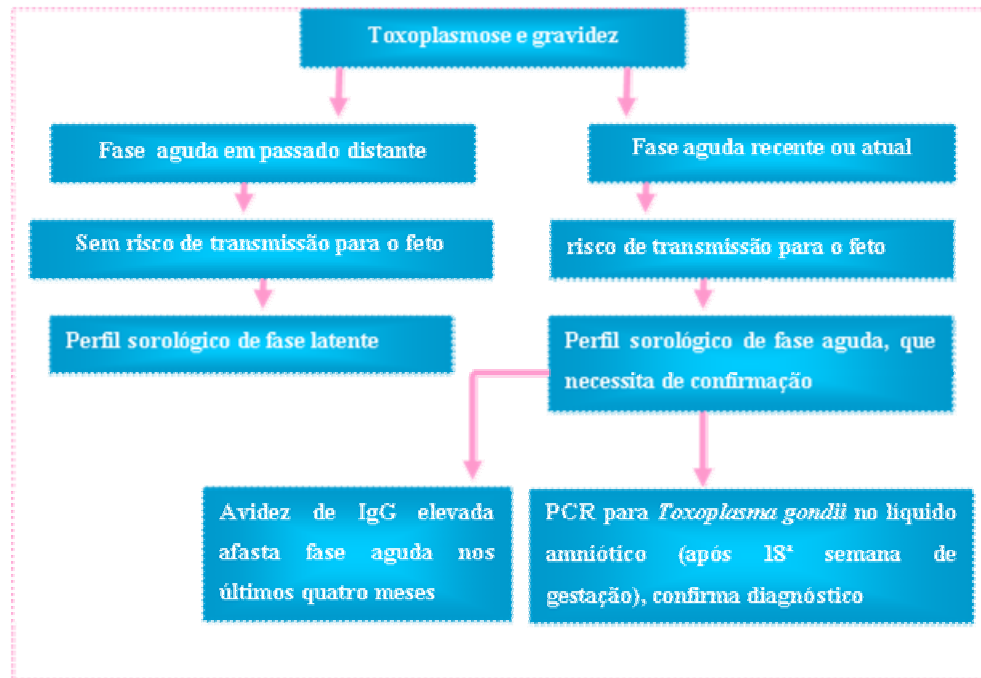


Figura 13. Símula do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose e gravidez.
Fonte: COUTINHO & VERGARA, 2005

Caso o teste apresente baixa avidéz, a conduta é repetir os testes de IgG e IgM, para detectar possível curva ascendente dos títulos, sugerindo infecção recente, ou utilizar outros testes, para detecção de IgA. Desta forma o teste de avidéz de IgG não Pode ser considerado definitivo, para diagnosticar a infecção recente ou em passado distante pelo *T. gondii* (REMINGTON et al., 2004).

4.6 Diagnóstico laboratorial no feto e recém-nato

O diagnóstico de toxoplasmose no feto quando é realizado durante a gestação, permite o tratamento da mãe e do feto, melhorando o prognóstico da infecção congênita. Os métodos utilizados para o diagnóstico são, a ultra-sonografia que detecta alterações macroscópicas como hidrocefalia ou calcificações cerebrais, enquanto a PCR, em líquido amniótico, é capaz de fazer o diagnóstico mesmo antes de terem surgido lesões mais extensas do SNC. A

sensibilidade da PCR não tem sido tão grande, presente em cerca de 70% dos casos (BASTIEN, 2002), entretanto, é maior que a detecção do parasito por inoculação do líquido amniótico dos pacientes infectados em camundongos.

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose no recém-nato se baseia na detecção de anticorpos específicos produzidos pelo próprio neonato (IgM e IgA), ficando assim caracterizada a exposição dele ao parasito. Os anticorpos IgG são passados da mãe para o feto pelo cordão umbilical, passando com facilidade pela placenta, sendo os títulos e a avidéz da IgG materna semelhante aos encontrados no recém-nato, tendo ou não, havido transmissão intra-uterina do parasito.

Os testes de anticorpos IgM e IgA específicos apresentam maior significado, pois representam anticorpos produzidos pelo neonato, levando a suspeita de infecção congênita (**Fig. 13**). O teste de pesquisa de IgA parece ser mais sensível do que o teste para IgM em recém-nascidos, havendo relatos de resultados falso positivos ou negativos no teste IgM (STEPICK-BIEK et al ., 1990). Por segurança um teste positivo para IgA deve ser repetido cerca de dez dias após, para certificar de que os títulos encontrados não representam contaminação com anticorpos IgA materno (MONTROYA 2002).

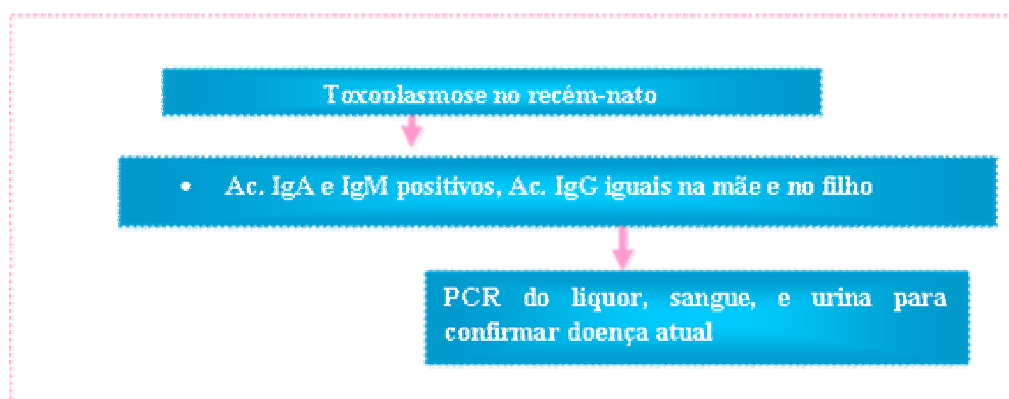


Figura 14. Símula do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose no recém-nato.
Fonte: COUTINHO & VERGARA, 2005

5. PROTEÔMICA

A proteômica estuda o conjunto de proteínas contidas numa célula, que são determinadas pelo genoma da mesma. Os estudos do proteoma (**proteômica**) têm-se desenvolvido principalmente por eletroforese bidimensional (2-D), por ser uma das técnicas de separação de proteínas mais poderosa e amplamente utilizada para a análise simultânea das centenas ou mesmo dos milhares de produtos dos genes, com uma capacidade original para identificação de proteínas isoladas (spots) provenientes de misturas complexas de amostras biológicas (MONTI et al., 2005; WOJTEK et al., 1999; BERKELMAN & STENSTEDT, 2002).

Em 1970, KENRICK & MARGOLIS publicaram a primeira técnica de 2-D para separação de proteínas por focalização isoeletrica (IEF) nativa, com gradientes de pH em gel. Alguns anos após, O'FARREL & KLOSE, (1975) introduziram o método original de focalização isoeletrica, promovendo a separação na primeira dimensão através de gradientes de pH gerados por carreadores anfólitos (moléculas pequenas, solúveis e anfotéricas com uma alta capacidade de neutralização próxima ao seu ponto isoeletrico (pI)), em géis de poliacrilamida distribuídos em tubos (capilares) de vidro (BERKELMAN & STENSTEDT, 2002).

Embora este método de 2-D tenha sido bastante utilizado, ele apresenta sérias limitações em relação aos carreadores anfólitos, por serem misturas de polímeros que não são bem caracterizados e sofrem variações devido ao aquecimento durante sua produção. Estas variações reduzem a reprodutibilidade de separação na primeira dimensão. Além disso, os gradientes de pHs com carreadores anfólitos são instáveis e sofrem forte desvio para o cátodo fora do tempo estipulado, resultante da alta corrente eletroosmótica ocasionada pelos grupos de cargas nas paredes dos tubos de gel. Conseqüentemente, causam também uma

depressão do gradiente de pH em cada ensaio, particularmente acima do pH 8.0, ocasionando uma menor utilização da técnica de 2-D para pHs extremos (BERKELMAN & STENSTEDT, 2002). Todavia, se este sistema for utilizado com uma base horizontal plana durante a separação, pode alcançar o pH 10 (DUNN et al., 1997).

As limitações e os problemas com os gradientes de pH formados pelos carreadores anfólitos, resultaram na necessidade da produção de gradientes de pH imobilizados (IPG). BJELLQVIST et al., (1982) e GÖRG., et al (1995) foram os pioneiros no desenvolvimento destes IPGs para a focalização isoeletrica na primeira dimensão da 2-D.

A utilização dos IPG produziu melhorias significativas para separação das proteínas através da 2-D, como uma definição mais elevada, possibilitando a utilização de faixas de pH mais estreitas e, apresentando unidades de variação de pH com 0.5-0.01 unids/cm, o que permitiu a discriminação de proteínas em que os pontos isoeletricos diferem em pH 0.01unids/cm, esta discriminação facilitou a reprodutibilidade da técnica permitindo o aperfeiçoamento da reprodutibilidade dentro de um laboratório, e mais importante entre laboratórios (CORBETT et al., 1994; BLOMBERG et al., 1995).

As proteínas básicas ($pI > 7,5$) normalmente perdidas pela atração para o cátodo ou separadas por NEPHGE (O'FARRELL et al., 1977), que apresentavam uma reprodutibilidade limitada, foram separadas perfeitamente sob circunstâncias de equilíbrio usando os IPG 4-9, 4-10, e 6-10 para a separação de proteínas de amostras altamente diversas tais como plantas, fermento, fígado de rato, coração humano, ou proteínas do mieloblasto (1991, 1993). Recentemente, foi gerado com sucesso um IPG muito alcalino (pH 12), para a 2-D de proteínas de histonas ribossomais (GÖRG et al., 1997, 2000). A maioria dos laboratórios desenvolve a 2-D usando rotineiramente fitas com gradientes de pH 3-10 ou 4-7 para exibir uma extensa variedade de proteínas. Todavia, para investigação mais detalhada de uma

pequena “janela” do proteoma, é indicado a utilização de 1unids/cm de pH, que permite a exibição de um grande número de proteínas.

Atualmente, a 2-D utilizada consiste na separação de proteínas e polipeptídios com base em suas diferentes propriedades moleculares, em cada uma das duas dimensões: na primeira dimensão a focalização isoeletrica (IEF) separa as proteínas de acordo com seus pI, em IPGs (Fig. 1). A segunda dimensão, em gel de poliacrilamida, separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares aparentes (M_r) (O’FARRELL, 1975; GARRELS, 1979; BRAVO, 1984).

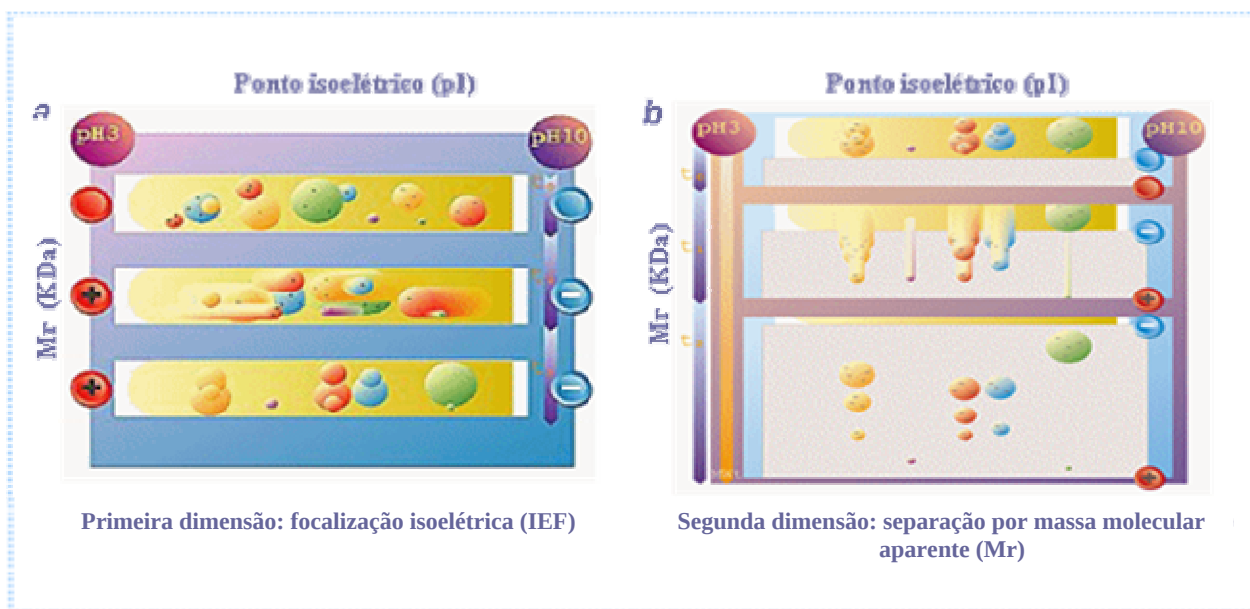


Figura 10. Esquema da eletroforese bidimensional (2-D): (a) focalização isoeletrica (IEF) das proteínas e em (b) separação de acordo com suas massas moleculares aparentes.

Fonte: www.google/electrophoresis2D.com.br

A análise da 2-D pode ser realizada utilizando-se softwares para análise de imagens 2-D, que permitem uma comparação quantitativa e qualitativa dos “spots” apresentados nos géis. Desde 1975, vários programas para análise de imagens têm sido desenvolvidos. O Swiss Instituto de Bioinformática (SIB) em colaboração com a GeneBio e Amersham Biosciences, tem desenvolvido e comercializado vários programas de análise de imagens 2-d como o

ImageMast 2D Elite (versão 4) e o ImageMast 2D Platinum (versão 5), que permitem o estudo de similaridades e diferenças entre imagens de 2-D, obtidas de amostras biológicas sob diferentes condições como sadios e doentes, tratados com drogas e sem tratamento, contribuindo para a identificação de marcadores terapêuticos moleculares, diagnóstico e prognóstico de doenças, dentre outras situações específicas (COHEN, et al., 2002).

Além das aplicações demonstradas a 2-D também permite a purificação de proteínas em pequena escala. Apesar da utilização preferencial das técnicas de cromatografia para purificação de proteínas em larga-escala, a purificação de pequenas quantidades de polipeptídios por 2-D micro-preparativa, apresenta resultados superiores. O aperfeiçoamento da tecnologia micro-preparativa por 2-D (BJELLQVIST et al., 1993) tem sido utilizada eficientemente para identificação de glicoproteínas variantes (PACKER et al., 1996). Os parâmetros obtidos experimentalmente caracterizam proteínas individuais que são então comparados com informações registradas em vários bancos de dados (BAIROCH et al., 1994).

A proteômica vem possibilitando o mapeamento e a caracterização de proteínas de várias populações (COHEN et al, 2002) através da 2-D, programas de análise de imagens, métodos de digestão enzimática, análise de proteínas por espectrometria de massa, imunoblotting e a bioinformática (**Fig. 16**) (PATTERSON et al., 2001; GRAVES et al., 2002; AEBERSOLD & MANN, 2003).

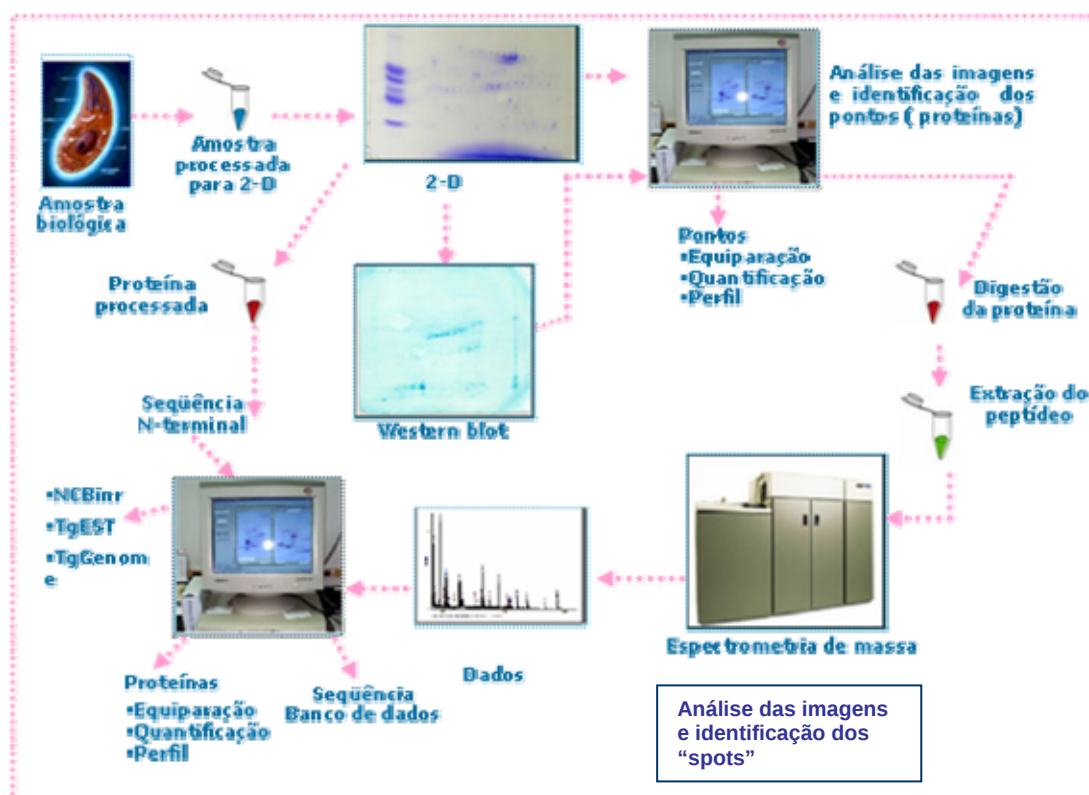


Figura 16. Estratégias para análise proteômica.

Fonte: Ilustração de Maria da Conceição Gomes Leitão

A espectrometria de massa é um poderoso método que pode facilitar a análise em micro-escala de proteínas e peptídeos. Recentemente foi desenvolvida uma nova geração de Espectrômetros de massa designados para serem utilizados em laboratórios de Biologia, assim com, os computadores avançaram para promover excelentes ferramentas de análises. O MALDI-MS (adsorção na matriz de laser, com bombardeamento de laser e ionização) promove rápida, sensível e acurada determinação da massa molecular e, das modificações químicas, de proteínas e peptídeos (HILLENKAMP et al., 1991; FENN et al., 1989; . YATES & MCCORMACK, 1996). A interface das 1-D e 2-D com o seqüenciamento N-terminal e a espectrometria de massa tem obtido ampla aceitação particularmente em áreas de identificação de proteínas utilizando métodos de pesquisa em banco de dados (BURLINGAME et al., 1996; WILKINS et al., 1996; PACKER et la., 1996).

O Immunoblotting combina a seletividade da 2-D à especificidade do ensaio imunoenzimático, permitindo que proteínas individuais, de misturas complexas possam ser detectadas e analisadas. (FERREIRA et al. 2002) utilizando vários marcadores como anticorpos específicos e lectinas, fornecem um dos mais efetivos métodos de estudo de proteínas (MONTI et al. 2005). Além disso, as proteínas imobilizadas podem ser seqüenciadas diretamente e, submetidas à análise dos aminoácidos por espectrometria de massa ou clivagem enzimática.

6. PROTEÔMICA DO *Toxoplasma gondii*

Os avanços recentes dos instrumentos para análise proteômica de células, organismos ou fluídos biológicos — eletroforese bidimensional (2-D), espectrometria de massa e bioinformática — têm possibilitado o mapeamento e a caracterização de proteínas de várias populações (COHEN et al., 2002). A utilização deste conjunto de ferramentas vem promovendo sucesso na caracterização das proteínas de alguns organismos incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (SHEVCHENKO et al., 1996) e *Haemophilus influenzae* (FOUNTOULAKIS et al., 1998a,b).

A conclusão recente dos projetos de genoma de alguns parasitos (ERSFELD, 2003; BAHLE et al., 2003; LI et al., 2004), vem impulsionando os estudos proteômicos de *Plasmodium* (FLORENS et al., 2002; LASONDER et al., 2002), *Eimeria tenella*, *Trypanosoma cruzi* (PABA et al., 2004), e *Leishmania major* (DRUMMELSMITH et al., 2003), como também, do *T. gondii* (COHEN et al., 2002; XING et al., 2005).

O genoma do *T. gondii* encontra-se em fase de conclusão, e dois estudos descreveram o mapeamento preliminar e a identificação parcial das proteínas da forma taquizoíta (forma presente na fase ativa da infecção) deste parasito, ambos através da 2-D e “immunoblotting” (DLUGONSKA et al., 2001), ou através de 2-D e MALDI-MS (COHEN et al., 2002). Estes estudos promoveram uma valiosa revisão de parte das proteínas acessórias do *T. gondii*.

O *T. gondii* apresenta um sistema altamente complexo, e bem orquestrado, de produção e regulação do processo secretor, que fornece proteínas para sua mobilidade, invasão da célula do hospedeiro, modulação da resposta imunológica do hospedeiro, sobrevivência intracelular, aquisição de nutrientes durante a replicação, e eventual saída da célula do hospedeiro. A secreção das proteínas ocorre em tempos específicos durante estes

processos, e envolve três organelas estruturalmente e funcionalmente distintas (**Fig. 17**): micronemas, rôptrias e grânulos densos (CARRUTHERS, 2002).

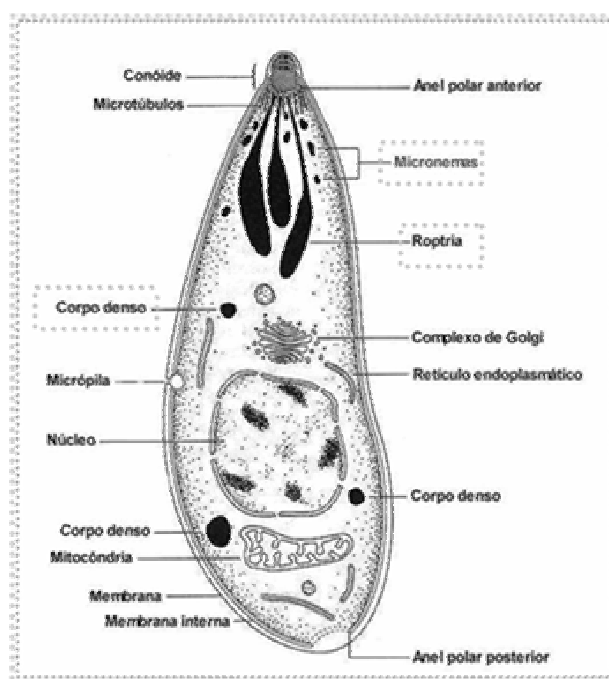


Figura 17. Estrutura da forma taquizoita do *Toxoplasma gondii*

Fonte: www.google.com/images/toxoplasma_gondii.com.br.

O processo de invasão da célula do hospedeiro pelo parasito inicia-se através da liberação das proteínas do micronema (MIC) sobre a ligação apical do parasito com a célula promovendo esta ligação e, a penetração na célula do hospedeiro (Tomley & Soldati. 2001); em seguida, as proteínas das rôptrias (ROP) são secretadas, e parecem ser críticas para a biogênese do vacúolo parasitóforo (PV) que envolve o parasito durante a invasão e da o suporte à interação deste com organelas da célula do hospedeiro (SINAI et al., 1997; NAKAAR et al., 2003); por fim, ocorre a secreção dos grânulos densos (GRA), durante e após a invasão, que preparam o vacúolo parasitóforo para a replicação e sobrevivência intracelular do parasito (CARRUTHERS & SIBLEY, 1997; ROBIBARO et al., 2001; SIBLEY, 2004). Estudos prévios revelaram que a secreção sequencial destas proteínas é crítica para o processo de invasão do parasito, assim como, para o estabelecimento da

infecção (LERICHE et al., 1990, CARRUTHERS et al., 1997). Outros estudos sugerem que o parasito libera produtos capazes de manipular a resposta imunológica do hospedeiro (BLADER et al., 2001; ALIBERTI et al., 2003) e, secretam produtos e antígenos de superfície (SAGs) que tem permitido investigar marcadores promissores para o diagnóstico (SUZUKI et al., 2000; JACOBS & SAMAN, 1999).

Estima-se que de 58% das proteínas secretadas pelo *T. gondii*, 8% apresentem sinal secretório com sinalização para o núcleo, 3% para mitocôndrias, 15% micronema, 1% róptrias, 12% grânulos densos, 7% Superfície, 1% Apicoplasto. Ainda, 30% não apresentaram sinalização, tendo localizando-se no citoplasma. Ainda, 21% das proteínas apresentam não apresentam sinal secretório (Fig. 18) (XING et al., 2005).

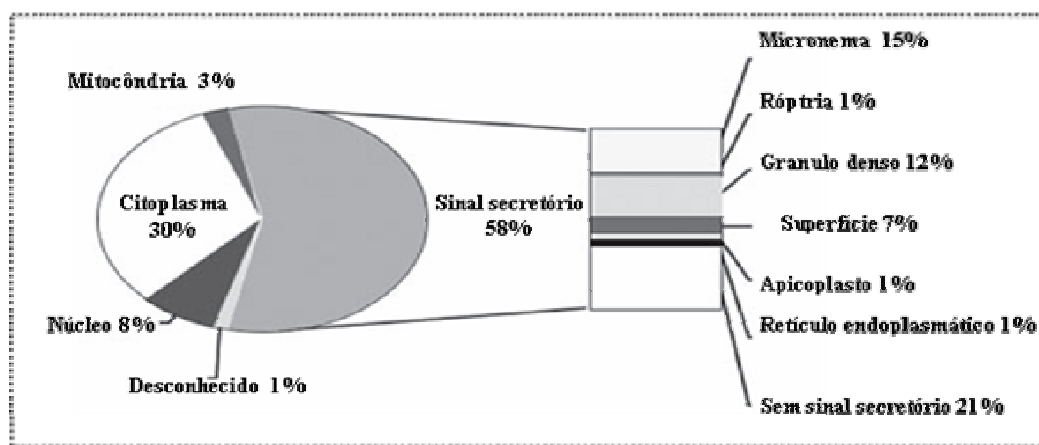


Figura 18. Esquema da localização das proteínas secretadas e excretadas pelo *Toxoplasma gondii*
 Fonte: XING et al., 2005.

Devido ao *T. gondii* ser um parasito intracelular obrigatório, os mecanismos de mobilidade e invasão celular são elementos essenciais para sua sobrevivência e propagação. Desta forma, na última década tem sido gerado um amplo banco de dados destes mecanismos, revelando vários detalhes sobre este complexo processo (revisado em SIBLEY, 2004; SOLDATI et al., 2004). As adesinas secretadas pelos MIC do complexo apical do parasito, tem como propósito unirem-se aos receptores da célula do hospedeiro, como: heparinas, proteoglicanos sulfatados, laminina e ICAM-1 (FURTADO et al., 1992 a,b;

CARRUTHERS & SIBLEY, 1997; ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD 1999; HARPER et al., 2004; BARRAGAN et al., 2005).

Durante a infecção natural, o *T. gondii* atravessa barreiras biológicas não tolerantes como as intestinais, barreira sangue-cerebral, placenta e barreira sangue-retina (BARRAGAN & SIBLEY, 2003), isto requer uma mobilidade ativa. Interessantemente, as integridades das barreiras das células do hospedeiro, não são alteradas durante este processo de transmigração.

No estudo desenvolvido por BARRAGAN et al., (2005), foi demonstrado que a interação do *T. gondii* com a molécula 1 (ICAM-1) do hospedeiro facilita a sua passagem através da monocamada polarizada, e isto ocorre provavelmente através da interação da ICAM-1 com a MIC2, adesina do parasito.

Alguns estudos do mesmo modo têm documentado a ligação celular ativa através das adesinas (MICs), incluindo MIC1, MIC2, MIC4, and MIC3 (GARCIA-REGUET et al., 2000; FOURMAUX et al., 1996; BRECHT et al., 2001; HARPER et al., 2004).

Embora, várias outras proteínas (MIC5, MIC10, M2AP, SUB1 e AMA1) não apresentem seqüências óbvias de adesina, sugere-se que estas proteínas tenham funções alternativas ou acessórias (BRYDGES et al., 2000; HOFF et al., 2001; MILLER et al., 2001; RABENAU et al., 2001). Uma outra característica das MIC produzidas pelo parasito é a freqüente reunião destas dentro de complexos protéicos para realização de trabalho em ajustes. Por exemplo, MIC6 associa-se a MIC1 e MIC4 (REISS et al., 2001), MIC8 a MIC3 (MEISSNER et al., 2002). Dentre estas, o complexo MIC2-M2AP, apresenta evidências de estar envolvido no processo de adesão e invasão do parasito (HUYNH et al., 2003; HARPER et al., 2004).

XING et al., (2005), desenvolveu um estudo amplo sobre os antígenos secretados, por taquizoítos do *T. gondii*, revelando mobilização de um opulento repertório de proteínas que podem interagir com o hospedeiro durante a infecção. Isto inclui as já mencionadas adesinas, que presumivelmente, contribuem para a ligação e penetração; as proteases que podem facilitar a invasão ou a migração dentro dos tecidos do hospedeiro; as enzimas metabólicas potencialmente envolvidas em aquisição de nutrientes e, uma série de proteínas de funções hipoteticamente desconhecidas; além de proteínas secretadas, similares, a proteínas expressas por outros parasitos relacionados como o *Plasmodium*, agente etiológico da malária. Estes resultados são significativos para ampliar a visão sobre as moléculas que contribuem para a sobrevivência do *T. gondii* e compreensão da sua patogenia durante a infecção.

O estudo de XING et al., (2005), ainda identificou 10 proteínas: GRADs, GRAD1, GRAD2, GRAD3, GRAD5, GRAD7, GRAD8, o inibidor de protease-1, e a NTPase I, II e III dos grânulos densos, que são secretadas em altas taxas logo após o parasito estar inteiramente dentro do vacúolo parasitóforo (BROSSIER et al., 2003; LINGELBACH et al., 1998). Em muitos casos, a função precisa destas proteínas permanece desconhecida, embora, várias observações sugiram a participação destas na produção do vacúolo parasitóforo e na interação deste com o citoplasma da célula do hospedeiro. A GRAD2 e GRAD6 têm papel importante na biogênese da membrana intravacuolar (MERCIER et al., 2002). Foi sugerido que a GRAD7 está envolvida na proteção imune, e que o aumento da síntese desta, esteja relacionado ao decréscimo da virulência do parasito. Recentemente, foi confirmado que a produção do inibidor da serina protease-1 (PSZENNY et al., 2002), presumivelmente, tem papel importante na proteção do *T. gondii* contra enzimas proteolíticas e na modulação da resposta imunológica do hospedeiro durante a fase aguda da infecção (MORRIS et al., 2002).

As isoformas da NTPase (Nucleosil Trifosfato Hidrolase), descrita por Asai (1983), apresenta um peso molecular de aproximadamente 240 – 260 kDa, sendo formada de quatro subunidades de cerca de 63 kDa. A NTPase é apresentada por outros protozoários, todavia, no *T.gondii* apresenta uma elevada atividade (ASAI et al, 1983; ASAI et al 1986). Esta enzima tem demonstrado colocação na replicação e crescimento intracelular do parasito, pois abastece o *T. gondii* com purinas (essencial para multiplicação do parasita), através de uma alta atividade enzimática na hidrolise do ATP e ADP em presença de compostos ditioneitol. Devido a isto, a NTPase possui grande atividade em taquizoítas e baixa atividade em bradizoítas (NAKAAR et al., 1999).

Após a invasão da célula hospedeira, a NTPase é secretada pelos grânulos denso para o lúmen do vacúolo parasitóforo, onde está freqüentemente associada a rede vacuolar (ASAI et al., 1987; SIBLEY et al., 1994). Entretanto, estudo de microscopia eletrônica, realizado por KIKUCHI (2001), utilizando anticorpo monoclonal (6C6 – IgG₁) também localizou esta enzima na membrana de taquizoítos.

Os membros do filo Apicomplexa são importantes protozoários parasitos que podem causar, doenças com danos mais graves e até mesmo, na maioria dos casos, fatais para humanos e animais. Dentre estes, o *T. gondii*, tem um impacto econômico, médico e veterinário. Embora estratégias químicas e imuno-profiláticas sejam úteis para controlar vários destes parasitos, são inadequados. Atualmente é requerido o desenvolvimento de novas vacinas ou quimioterápicos para estes patógenos. A análise global de proteínas expressas utilizando as ferramentas proteômicas tem promovido meios para identificação de novas drogas e vacinas (BELLI et al., 2004).

O *T. gondii* apresenta proteínas secretoras que são antígenos potentes, e que podem, com grande poder, acionar a resposta imunológica. Esta peculiaridade promove algumas

proteínas antigênicas, a candidatos promissores para desenvolvimento de vacinas, especialmente utilizando os linfócitos T para realizar esta seleção (FISCHER et al., 1996; PRIGIONE et al., 2000). Isto tem sido apresentado em camundongos inatos, que vacinados com DNA de ROP2, GRA1 e GRA7, induziram uma proteção imune parcial contra infecção letal (VERCAMMEN et al., 2000). Seguindo esta linha, REICHMANN et al., (2002), descreveu e caracterizou um clone molecular da proteína ROP9 (p36), das róprias do *T. gondii* identificada através de clones células T CD4⁺ para a proteína p36 (36 KDa), presente na fração solúvel dos taquizoítos lisados.

A existência de uma grande quantidade de NTPase em taquizoíto, levantou a possibilidade da mesma ser detectada como antígeno circulante no sangue de indivíduos infectados e também um alvo em potencial para quimioterapia (ASAI et al., 1987; NAKAAR et al., 1999; ASAI et al., 2002).

A Toxoplasmose tem como problemática seu difícil diagnóstico, tanto clínico quanto laboratorial. Principalmente, no que diz respeito à identificação precoce da fase ativa da infecção pelo parasito. O que possibilitaria um tratamento adequado e efetivo dos indivíduos infectados, permitindo a prevenção, amenização ou mesmo a eliminação dos vários danos causados por este parasito. Desta forma, o aperfeiçoamento de técnicas imunodiagnósticas, utilizando proteínas antigênicas bem caracterizadas do parasito poderá minimizar ou até abolir as lacunas atuais existente no diagnóstico. Alguns trabalhos, utilizando ferramentas proteômicas, já vêm sendo desenvolvidos para estes fins.

NIELSEN et al. (2005) utilizaram a 2-D e o immunoblotting, para caracterizar proteínas antigênicas na transmissão congênita da toxoplasmose. Os autores observaram perfis diferentes de expressão protéica quando comparados os soros de mães soro convertidas durante a gestação e soros de seus respectivos recém-nascidos infectados. Os

resultados desse estudo podem contribuir para uma maior especificidade na utilização do diagnóstico diferencial da toxoplasmose congênita.

NAKAJIMA-NAKANO et al., (2002) produziram NTPase (NTPase I e II) recombinantes, como antígeno, em teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti- NTPase em soros de indivíduos imunocompetentes na fase aguda da toxoplasmose e correlacionaram os resultados deste teste aos resultados de um teste padrão ouro (reação de Sabin-Feldman) utilizando os mesmos soros. Os resultados obtidos demonstraram um alto percentual (93%) de positividade e uma correlação de 0,964 (r^2) entre o ELISA (formado com antígeno recombinante) e a reação de Sabin- Feldman.

A utilização de análise proteômica na caracterização de proteínas antigênicas do *T.gondii* de cada forma evolutiva do parasito aliada à utilização de técnicas imunodiagnósticas, seja na detecção de imunoglobulinas para estas proteínas, seja na indução de anticorpos monoclonais para as mesmas poderá permitir a identificação da fase da doença em que o indivíduo se encontra , o que é de grande importância para o diagnóstico da toxoplasmose ocular, assim como, da toxoplasmose em gestantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABREU MT, BELFORT JR R, ORÉFICE, F. Toxoplasmose Ocular. In: Oréface F, Belfort Jr R (eds) **Uveítes**, Roca, São Paulo, p. 211-230, 1987.
- AEBERSOLD, R., AND MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics **Nature** 422, 198–207, 2003.
- AIZENBERG, D.; COGNE, N.; PARIS, L.; BESSIERRES, M.T.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDE, M.L. Genotypes of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis. **J Infect Dis** 186: 684-689, 2002.
- ALIBERTI, J., VALENZUELA, J. G., CARRUTHERS, V. B., HIENY, S., ANDERSEN, J., CHAREST, H., REIS E SOUSA, C., FAIRLAMB, A., RIBEIRO, J. M., AND SHER, A. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. **Nat. Immun.** 4: 485–490, 2003.
- AMBROISE-THOMAS,P. &PELLOUX, A. toxoplasmosis: congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasitol today**. 9: 61-63, 1993.
- AMENDOEIRA, M. R. R. Diagnóstico de la Toxoplasmosis Congênita. **Rev. Cubana Invest. Biomed.** 20 (2): 118-121, 2001
- AMENDOEIRA, M. R. R., SOBRAL, C. A. Q., TEVA, A., NAZARENO DE LIMA, J., KLEIN, C. H. Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato Grosso. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.** 36 (6): 671-676, 2003.
- ARAÚJO, F.A.P. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em doadores e de sangue. **Rev Inst Méd Trop.** São Paulo 12: 105-111,1970.
- ARAUJO, F.G; SOUZA, W.J.S.; SILVA, N.R.S.; RODRIGUES, R.J.D. Inquérito epidemiológico sobre a toxoplasmose em granjas de saínos na região da grande Erechim, R.S, Brasil. **Arq Fac Vet UFRGS**. 28: 61-69, 2000.
- ASAI, T., KIM, T., KOBAYASHI, M., KOJIMA, S. Detection of Nucleoside Triphosphate Hydrolase as a Circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.** 55 (5): 1332-1335, 1987.
- ASAI, T., O’SULLIVAN, W. J., TATIBANA, M. A potent Nucleoside Triphosphate Hydrolase from the Parasitic Protozoan *Toxoplasma gondii*. **J. Biol. Chem.** 258 (11): 6816-6822, 1983.
- ASAI, T., TAKEUCHI, T., DIFFENDERFER, J., SIBLEY, L. D. Identification of small-molecule inhibitors of Nucleoside Triphosphate Hydrolase in *Toxoplasma gondii*.. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46 (8): 2393-2399, 2002.

- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., JONES, J. L., AZEVEDO-SILVA, J., ALVES, C. C. F., ORÉFICE, F., ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** 9 (1): 55-62, 2003.
- BAHL, A., BRUNK, B., CRABTREE, J., FRAUNHOLZ, M. J., GAJRIA, B., GRANT, G. R., GINSBURG, H., GUPTA, D., KISSINGER, J. C., LABO, P., LI, L., MAILMAN, M. D., MILGRAM, A. J., PEARSON, D. S., ROOS, D. S., SCHUG, J., STOECKERT, C. J., JR., AND WHETZEL, P. PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data. **Nucleic Acids Res.** 31: 212–215, 2003.
- BAIROCH, A.; HOCHSTRASSER D.F., A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation **Electrophoresis** 16: 113, 1994.
- BARRAGAN, A. & SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **J. Exp Med.** 195: 1625-33, 2002.
- BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell Microbiol** 7:561–568, 2005.
- BARUZZI, R.G. Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the Indians of the upper Xingu river. Central Brazil. **Rev Inst Med Trop.** São Paulo 12: 93-104, 1970.
- BASTIEN, P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 96 (suppl. 1) S1/205-S1215, 2002.
- BEAMAN, M. H. Toxoplasmosis. In: MADEL, G.L.; BENNETT, J.E.; DULIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 4ed. New York: Churchill Livingstone. 2.455-2.475, 1995.
- BELLI, I.S.; ROBERT, A. W.; FLOWERS, S.A. Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: Current status. **Institute for Biotechnology of Infectious Diseases**, 2004.
- BERKELMAN, T. & STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis-Principles and Methods, **Amersham Biosciences**. 80: 6429-60, 2002.
- BERTOLI F, ESPINO M, AROSEMENA JR, FISHBACK JL, FRENKEL JK. A spectrum in the pathology of toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** 119: 214-224, 1995.
- BJELLQVIST B, EK K, PÁGINA DE RIGHETTI, GIANAZZA E, GÖRG A, WESTERMEIER R, POSTEL, focalizar isoelectric de W (em gradients immobilized do pH: Princípio, metodologia e algumas aplicações. **Métodos 6 Do Biochem Biophys De J**: 317-339, 1982.
- BJELLQVIST B, SANCHEZ JC, PASQUALI C, RAVIER F, PAQUET N, FRUTIGER S, HUGHES GJ, Micropreparative electrophoresis bidimensional de Hoch-strasser DF (permitindo a separação das amostras que contêm quantidades do milligram de proteínas. **Electrophoresis** 14: 1375-1378, 1993.

- BLADER, I. J., MANGER, I. D., AND BOOTHROYD, J. C. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. **J. Biol. Chem.** 276: 24223–2423, 2001.
- BLOMBERG A, BLOMBERG L, FEY SJ, LARSEN PM, ROEPSTORFF P, DEGAND P, BOUTRY M, POSCH A. reproducibility interlaboratory de Görg A (dos testes padrões da proteína do fermento analisados pelo electrophoresis bidimensional immobilized do gel do gradient do pH. **Electrophoresis** 16: 1935-1945, 1995.
- BORGES, A. S. & FIGUEIREDO, J. F. C. Evaluation of intrathecal synthesis of specific IgG antibodies against *Toxoplasma gondii* in the diagnosis assessment of presumptive *toxoplasma* encephalitis in aids patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 37(6):480-484, nov-dez, 2004.
- BOSCH-DRIESSEN, L.EH.; BERENDSCHOT, T.T.J.; ONGKOSUWITO, J.V.; ROTHOVA, A. Ocular toxoplasmosis. Clinical features and prognosis in 154 cases. **Ophtalmology.** 109: 869-878. 2002.
- BRAVO, R.; J CELIS, E. IN: J.E. CELIS, R. BRAVO (Eds.), Two- Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: **Methods and Applications**, Academic Press, Orlando, p. 445.,1984.
- BRECHT, S., CARRUTHERS, V. B., FERGUSON, D. J., GIDDINGS, O. K., WANG, G., JAEKLE, U., HARPER, J. M., SIBLEY, L. D., AND SOLDATI, D. The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains **J. Biol. Chem.** 276: 4119–4127, 2001.
- BROSSIER, F., JEWETT, T. J., LOVETT, J. L., AND SIBLEY, L. D. C-terminal processing of the toxoplasma protein MIC2 is essential for invasion into host cells. **J. Biol. Chem.** 278: 6229–6234, 2003.
- BRYDGES, S. D., SHERMAN, G. D., NOCKEMANN, S., LOYENS, A., DAUBENER, W., DUBREMETZ, J. F., AND CARRUTHERS, V. B. Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii* **Mol. Biochem. Parasitol.** 111: 51–66, 2000.
- BURLINGAME, A.L. BOYD, R.K. GASKELL, S.J. Mass spectrometry. **Anal. Chem.** 68 599R, 1996.
- CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; LESER, W.S.P. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis, I- A comparative study of hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence test in 7,752 serum samples. **Rev Inst Med Trop.** São Paulo 18:215-226, 1976.
- CAMARGO, M. E. Toxoplasmose in **Diagnóstico laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e auto-imunes**. Org: Antonio Walter Ferreira e Sandra L. M. Ávila, Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro - RJ, 2ª ed., pp: 278 -288, 2001.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose in **Diagnóstico laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e auto-imunes**. Org: Antonio Walter Ferreira e Sandra L. M. Ávila, Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro - RJ, pp:165-174, 1996.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose in *Diagnóstico laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e auto-imunes*. Org: Antonio Walter Ferreira e Sandra L. M. Ávila, Guanabara –Koogan, Rio de Janeiro - RJ, 2ª ed., pp: 278 -288, 2001.

CARMO, E. L.; ALMEIDA, E.F.; BICHARA, C. N.; PÓVOA, M. M. Pesquisa de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em fluidos intra-oculares (humor vítreo e humor aquoso) de pacientes com toxoplasmose ocular, na Cidade de Belém, PA **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38(1):77-79, 2005.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop.** 81: 111–122, 2002.

CARRUTHERS, V. B., AND SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts **Eur. J. Cell Biol.** 73: 114–123, 1997.

CARVALHO, C. M. C. N., FARHAT, C. K. Toxoplasmose adquirida. **J. de Pediatria.** 75, Supl. 1: S63-S67, 1999.

CLOUG, L.A.; CLOUG, J.A.; MACIUNAS, J.R. Diagnosing CNS mass lesions in patients with AIDA. **The AIDS Reader.** 7: 83-88, 1997.

COELHO, R. A. L., KOBAYASHI, M., CARVALHO, L.B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 45 (4): 229-231, 2003.

COHEN, A. M., RUMPEL, K., COOMBS, G. H., WASTLING, J. M. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomic of *Toxoplasma gondii*. **Int. J for Parasitol.** 32: 39-51, 2002.

CORBETT J, DUNN MJ, POSCH A, reproducibility posicionais de GÖRG A (de pontos da proteína no electrophoresis bidimensional do gel de polyacrylamide usando o gradient immobilized do pH que focaliza iso-electric na primeira dimensão: Uma comparação interlaboratory. *Electrophoresis* 15: 1205-1211, 1994.

COUTINHO, S.G., & VERGARA, T.R.C. **Dinâmica das Doenças Infecciosas eParasitárias**. Editora Guanabara KOOGAN S.A., volume 1, 2005.

COUTINHO, S.G.; LOBO, R.; DUTRA, G. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area. **J Parasitol.** 68: 866-868, 1982.

COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; CAMILO-COURA, L.; MARZOCHI, M.C.A.; AMENDOEIRA, M.R.R. Levantamento dos resultados da reação de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 6.079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro realizadas

durante os anos de 1971 a 1977. **Rev Inst Med Trop.** São Paulo 23: 48-56, 1981.

COUTO, J. C. F., LEITE, J. M., RODRIGUES, M. V. Diagnóstico laboratorial da Toxoplasmose na gestação. **Femina.** 30 (10): 731-737, 2002.

DARDÉ, M.L.; BOUTEILLE, B.; PRESTRE-ALEXANDRE, M.; Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and serological implications. **J Parasitol.** 78: 786-794, 1997.

DESMONTS G, COUVREUR J, ALISON F, BAUDELOT J, GERBEAUX J, LELONG M. E Â tude eÂpideÂmiologique sur la toxoplasmose: de l'inuence de la cuisson des viandes de boucherie sur la freÂquence de l'infection humaine. **Rev Fr EÂtud Clin Biol.** 10:952±8, 1965.

DINA, T.S. Pirmary central nervous system lymphoma versus toxoplasmosis in AIDS. **Clin Microbiol Rev.** 11: 569-599, 1991.

DLUGONSKA, H., DYTNERSKA, K., REICHMANN, G., STACHELHAUS, S., AND FISCHER, H. G. Towards the *Toxoplasma gondii* proteome: position of 13 parasite excretory antigens on a standardized map of two-dimensionally separated tachyzoite proteins. **Parasitol. Res.** 87: 634–637, 2001.

DRUMMELSMITH, J., BROCHU, V., GIRARD, I., MESSIER, N., AND OUELLETTE, M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Mol.Cell. Proteomics** 2: 146–155, 2003.

DUBEY JP, KIRKBRIDE CA. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. **J Am Vet Med Assoc** 195:1715±6, 1989.

DUBEY JP, ROMAND S, HILALI M, KWOK OCH, THULLIEZ P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. **Int J Parasitol**; 28:527±9, 1998.

DUBEY JP. The scienti@c basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. In: Ambroise-Thomas P, Petersen E, editors. *Congenital toxoplasmosis: scienti@c background, clinical management and control.* Paris: **Springer-Verlag**, pp. 271±5, 2000.

DUBEY, J.P.; GAMBLE, H.R.; HILL, D. SREEKUMAR, C.; ROMAND, S.; THUILLIEZ, P. High prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. **J Parasitol.** 88: 1234-1238, 2002a.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H.H.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; THUILLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* INFECTIONS IN CATS FROM Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and genetic characterization of isolates. **J Parasitol.** 90: 721-726, 2002b.

DUNLOP O, ROOTWELT V, SANNES M, GOPLEN AK, ABDELNOOR M, SKAUG K, BAKLIEN K, SKAR A, MELBY K, MYRVANG B, BRUUN JN. Risk of toxoplasmic encephalitis

in AIDS patients: indications for prophylaxis. **Scandinavian Journal Infectious Diseases** 28: 71-73, 1996.

DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PERTESSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R. Mother-to-child transmission de toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancete**. 353: 1829-1833, 1999.

DUNN, M.J. in: B.J. Smith (Ed.), **Protein Sequencing Protocols**, Methods in Molecular Biology, Vol. 64, Humana Press, Totowa, NJ, , p. 25. 1997.

DUTRA LEÃO, P. R., MEIRELLES FILHO, J., MEDEIROS, S. F. Toxoplasmose: Soroprevalência em puérperas atendidas pelo sistema único de saúde. **RBOG**. 26 (8): 627-631, 2004.

EDELHOFER R, ASPOÈCK H. Infektionsquellen und Infektionswege ausder Sicht des Toxoplasmose-Screenings der Schwangeren in OÈ sterreich. **Mitt OÈ sterr Ges Tropenmed Parasitol**.18:59±70, 1996.

ERSFELD, K. Genomes and genome projects of protozoan parasites.Curr. Issues Mol. Biol. 5, 61–74, 2003.

FENN, J.B. MANN, M. MENG, C.K. WONG, S.F. WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science** 246: 64, 1989.

FERREIRA, M. S., BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – A review. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**. 97 (4): 443-457, 2002.

FISCHER HG, REICHMANN G, HADDING U. *Toxoplasma* proteins recognized by protective T lymphocytes. **Curr Top Microbiol Immunol**. 219:175–82, 1996.

FLORENS, L., WASHBURN, M. P., RAINE, J. D., ANTHONY, R. M., GRAINGER, M., HAYNES, J. D., MOCH, J. K., MUSTER, N., SACCI, J. B., TABB, D. L., WITNEY, A. A., WOLTERS, D., WU, Y., GARDNER, M. J., HOLDER, A. A., SINDEN, R. E., YATES, J. R., AND CARUCCI, D. J. The complete genome sequence of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum* **Nature** 419: 520–526, 2002.

FOUNTOULAKIS, M., JURANVILLE, J.F., RODER, D., EVERS, S., BERNDT, P., LANGEN, H., Reference map of the low molecular mass proteins of *Haemophilus influenzae*. **Electrophoresis** 19:1819–27, 1998a.

FOUNTOULAKIS, M., TAKACS, B., LANGEN, H. Two-dimensional map of basic proteins of *Haemophilus influenzae*. **Electrophoresis** 19:761–6, 1998b.

FOURMAUX, M. N., ACHBAROU, A., MERCEREAU-PUIJALON, O., BIDERRE, C., BRICHE, I., LOYENS, A., ODBERG-FERRAGUT, C., CAMUS, D., AND DUBREMETZ, J.-F. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Mol. Biochem. Parasitol**. 83: 201–210, 1996.

FRENKEL, J.K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitol. Today**, 4 (100): 273-278, 1988.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis testing during pregnancy. **JAMA**, 265 (2): 211, 1991.

FRENKEL, J.K.; RUIZ, A.A; CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma gondii* in Kansas and Costa Rica. **Am J Trop Med Hyg.** 24: 439-443, 1975.

FRENKEL, J.K.; & RUIZ, A. Human toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica. **Am J Trop Med Hyg.** 29: 1167-1180, 1981.

FURTADO GC, CAO Y, JOINER KA LAMININ. On *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the b1 integrin receptor $\alpha 6/ \beta 1$ on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. **Infect Immun** 60:4925–4931, 1992a.

FURTADO GC, SLOWIK M, KLEINMAN HK, JOINER KA. Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. **Infect Immun** 60:2337–2342, 1992b.

GARCIA-REGUET, N., LEBRUN, M., FOURMAUX, M.-N., MERCEREAU-PUJALON, O., MANN, T., BECKERS, C. J. M., SAMYN, B., VAN BEEUMEN, J., BOUT, D., AND DUBREMETZ, J.-F. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. **Cell. Microbiol.** 2: 353–364, 2000.

GARRELS, J.I. Two dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines.. **J. Biol. Chem.** 25: 7961-77, 1979.

GLASNER PD, SILVEIRA C, KRUSZON-MORAN D, MARTINS MC, BURNIER JR M, SILVEIRA S, CAMARGO ME, NUSSENBLATT RB, KASLOW RA, BELFORT JR. R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology** 114: 136-144, 1992.

GÖRG A, BOGUTH G, OBERMAIER C, POSCH A, ELECTROPHORESIS BIDIMENSIONAIS DO GEL DE POLYACRYL-AMIDE DE WEISS W. com gradientes imobilizado do pH na primeira dimensão (IPG-Dalt): O último modelo e a controvérsia do vertical contra sistemas horizontais . **Electro-phoresis** 16: 1079-1086, 1995.

GÖRG A, Obermaier C, Boguth G, Csordas A, Diaz JJ, pH gradients immobilized muito alcalinos de Madjar JJ (para o electrophoresis bidimensional de proteínas ribossomal e nucleares. **Electrophoresis** 18: 328-337, 1997.

GÖRG A, POSTEL W, FRIEDRICH C, KUICK R, JR. DE STRAHLER, variability posicionais do ponto Temperatura-dependente de Hanash MANUTENÇÃO PROGRAMADA em testes padrões bidimensionais do polypeptide . **Electro-phoresis** 12: 653-658, 1991.

GÖRG, A.; Obermaier, C.; Bouguth, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis.** 21: 1037-1053, 2000.

GÖRG, A. electrophoresis bidimensionais de (com gradientes immobilized do pH: estado atual. **Transações Biochemical** 21 Da Sociedade: 130-132, 1993.

- GRANT, I.; GOLD, J.; ROSEMBLUM, M. *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis. *AIDS*. 4:519-521, 1990.
- GRAS, L. ; GILBERT, R.E.; WALOON, M.; PEYRON, F.; CORTINA-BORJA, M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implication of clinical pratic and crossetional incidence studies. **Epidemiol Infect.** 132: 541-548, 2004.
- GRAVES, P. R., AND HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 66, 39–63, 2002.
- GRIGG, M.E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J.C.; MARGOLIS, T.P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **J Infect Dis** 184: 633-639, 2001.
- HARPER, J.M. HOFF , E.F. CARRUTHERS, V.B. Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. **Mol Biochem Parasitol** 134:201–212, 2004.
- HEDMAN, K. LAPPALAINEN, M.; SEPPALA, I. MAKELA, O.; Recente primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J Infect Did.** 159: 736-739, 1989.
- HILLENKAMP, F. M. KARAS, R.C. BAEVIS, B.T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Chait, Anal. Chem.** 63: 1193A-1203A. 1991.
- HINRICHSSEN, S. L., TAVARES NETO, J. I., PONTES NETO, N. T., MENDONÇA, P. M., SILVA, P. F. S., SILVA, P. L. S. Toxoplasmose. in **Medicina Tropical – Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias.**, Org: Rodrigo Siqueira Batista, Andréia Patrícia Gomes, Ricardo Pereira Igreja, Donald William Huggins, Cultura Médica, Rio de Janeiro – RJ, pp: 193 - 203, 2001.
- HIRAMOTO, R.M.; MAYBAURL-BORGES, M.; GALISTEO, J.R MEIRELES, L.R.; MACRE, M.S.; & ANDRADRE-JUNIOR, H.F. Infectivity of cysts of the ME49 *Toxoplasma gondii* strain bovine milk and homemade cheese. **REV. Saúde Pública**, 35: 113-118, 2001.
- HOFF, E. F., CARRUTHERS, V. B. In *Toxoplasma* egress the first step in invasion? **Trends Parasitol.** 18 (6): 251-255, 2002.
- HOFF, E. F., COOK, S. H., SHERMAN, G. D., HARPER, J. M., FERGUSON, D. J., DUBREMETZ, J. F., AND CARRUTHERS, V. B. *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10. **Exp. Parasitol.** 97: 77–88, 2001.
- HOHOLFELD, P.; DAFFOS, F.; COSTA, J.M.; THULLIEZ, P.; FORESTIER, F.; VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital oxoplasmosis with a polymerase-chain reaction test on amniotic fluid. **N Engl J Med.** 331: 695-699, 1994.
- HOLLAND, G.N.; O’CONNOR, G.R.; BELFORT, R. Jr. REMINGOTN, J.S. Toxoplasmosis, In: Pepose JS.; HOLLAND, G.N.; WIHELMUS, K.R. EDS. **Ocular infection and immunity**. St. Louiz: Mosby Yearbook, 1183-223, 1996.

- HOME, D.K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J Clin Microbiol.** 35: 1411-1414, 1997.
- HOME, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal linagens: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis.** 172: 1561-1566, 1995.
- HO-YEN DO, JOSS AWL. Human toxoplasmosis. Oxford: **Oxford University Press**, 1992.
- HUYNH, M. H., RABENAU, K. E., HARPER, J. M., BEATTY, W. L., SIBLEY, L. D., AND CARRUTHERS, V. B. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. **EMBO J.** 22: 2082–2090, 2003.
- ISRAELSKI, D.M.; & REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. **Curr Clin Top Infect Dis.** 13: 322-356, 1993.
- JACOBS, D., VERCAMMEN, M., AND SAMAN, E Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain.. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 6: 24–29, 1999.
- JANITSCHKE K. PRAÊNATALE U.È. bertragung der Toxoplasmen von der Mutter auf das Kind. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch – **Gesundheitsschutz.** 2:548±52, 1999.
- KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii* in: **Parasitologia Humana.**, Org: David Pereira Neves, Alan Lane de Melo, Pedro marcos Linardi, Ricardo W. Almeida Vitor, Atheneu, São Paulo – SP, 11ª ed, pp: 163 - 203, 2005.
- KEAN, B.A.; KIMBALL, A.C; CHRISTENSEN, W.N. An epidemic of acute toxoplasmosis. **J Am Med Ass.** 208: 1002-1004, 1969.
- KENRICK KG, MARGOLIS, J. Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique **Anal. Biochem.** 33: 204-7. 1970.
- KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C. MACKEY, A.J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, .; TANG, K.; PAULSEN, I.T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J.C.; PFEFFERKORN, E. R. DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROOS, D.S.; WOOTTON, J.C. AND SIBLEY, L.D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii* 2980–2992 **Nucleic Acids Research**, Vol. 33, No. 9 :10.1093/nar/gki604, 2005.
- KIKUCHI, T., FURUTA, T., KOJIMA, S. Membrane localization and demonstration of isoforms of Nucleoside Triphosphate Hydrolase from *Toxoplasma gondii*. **Parasitology.** 122: 15-23, 2001.
- KOBAYASHI, M., MALAGUEÑO, E., SANTANA, V., PEREZ E. P., YANO, A. Prevalence of Toxoplasmosis in Northeasten Brazil. **Jpn J. Trop. Med. Hyg.** 30: 305-310, 2002.
- LASONDER, E., ISHIHAMA, Y., ANDERSEN, J. S., VERMUNT, A. M., PAIN, A., SAUERWEIN, R. W., ELING, W. M., HALL, N., WATERS, A. P., STUNNENBERG, H. G., AND MANN, M. The complete genome sequence of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. **Nature** 419: 537–542, 2002.

- LEBECH, M.; ANDERSEN, O.; CHRISTENSEN, N.C.; HERTEL, J. NIELSEN, H.E.; PEITERSEN, B.; REICHINITZER, C.; LARSEN, S.O.; PERDESEN, B.N.; PETERSEN, E. Feasibility of neonatal screening for *Toxoplasma* infection in the absence of prenatal treatment. **Lancet**. 353: 1834-1837, 1999.
- LEHMANN, T. BLAKSTONE, C.R.; PARMLEY, S.F.; REMINGTON, J.S.; DUBEY, J.P. Strains typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. **J Parasitol**. 86: 960-971, 2000.
- LERICHE, M. A., AND DUBREMETZ, J. F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. **Parasitol. Res**. 76: 359-362, 1990.
- LI, L., CRABTREE, J., FISCHER, S., PINNEY, D., STOECKERT, C. J., JR., SIBLEY, L. D., AND ROOS, D. S. ApiEST-DB: analyzing clustered EST data of the apicomplexan parasites. **Nucleic Acids Res**. 32: D326-D328, 2004.
- LINGELBACH, K., AND JOINER, K. A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. **J. Cell Sci**. 111, 1467-1475, 1998.
- LIONS, R.E.; McLEOD, R.; & ROBERTS, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradizoite interconversion. **Trends in Parasitology**, 18: 198-201, 2002.
- LUFT B.J. *Toxoplasma gondii*. In: Walzer PD, Genta RM, editors. Parasitic infections in the compromised host. New York: **Marcel Dekker**, pp. 179-279, 1989.
- LUFT, B. ; REMINGTON, J. AIDS commentary. Toxoplasmosis encephalitis. **J Infect Dis** 157: 1-6, 1988.
- LUFT, B.; BILLINGHAM, M.; REMINGTON, J.S. Endomyocardial biopsy in the diagnosis of toxoplasmosis myocarditis. **Transplant Proc**. 18: 1871-1873, 1986.
- LUFT, B.; NAOT, Y.; ARAUJO, F.G. Primary and reactivated *Toxoplasma* infection in patients with cardiac transplants. Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population. **Ann Intern Med**. 99: 27-31, 1983.
- LYNCH, M. I., CORDEIRO, F., FERREIRA, S., XIMENES, R., ORÉFICE, F., MALAGUEÑO, E. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveitis induced by *Toxoplasma gondii*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 99 (8): 861-864, 2004.
- MAGALDI, C.; ELKIS, H.; PATOLLI, D.; QUEIROZ, J.C.; COSCINA, A.L.; FERREIRA, J.M. Surto de toxoplasmose em seminário de Bragança Paulista (Estado de S. Paulo). Aspectos clínicos sorológicos e epidemiológicos. **Rev Saúde Públ**, São paulo. 1: 141-171, 1967.
- MEEK B; KLAREN VINCENT NA; VAN HAERINGEN NJ; KIJLSTRA A and PEEK R. IgA antibodies to *Toxoplasma gondii* in human tears. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**. 41: 2584-2590, 2000.
- MEIRELLES FILHO, J. Toxoplasmose e gravidez. Inquérito sorológico em gestantes e seus recém-nascidos na maternidade-escola a Universidade Federal do Rio de Janeiro. **J Brás. Ginec.**, 95: 393-401, 1985.

- MEISSNER, M., REISS, M., VIEBIG, N., CARRUTHERS, V., TOURSEL, C., TOMAVO, S., AJIOKA, J., AND SOLDATI, D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. **J. Cell Sci.** 115: 563–574, 2002.
- MERCIER, C., DUBREMETZ, J. F., RAUSCHER, B., LECORDIER, L., SIBLEY, L. D., AND CESBRON- DELAUW, M. F. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. **Mol. Biol. Cell** . 13: 2397–2409, 2002.
- MILLER, S. A., BINDER, E. M., BLACKMAN, M. J., CARRUTHERS, V. B., AND KIM, K. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii* . **J. Biol. Chem.** 276: 45341–45348, 2001.
- MONTI, M.; ORRU', S.; PAGNOZZI, D.; PUCCI, P. Interaction Proteomics **Bioscience Reports**, 25: 10540-005-2847, 2005 .
- MONTOYA JG, REMINGTON JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases** 23: 277-282, 1996.
- MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and Toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** 185 (Suppl. 1): S73- 82, 2002.
- MONTOYA, J.G. & LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet.** 363: 1965-76, 2004.
- MONTOYA, J.G.; JORDAN, R.; LINGAMMENI, S.; BERRY, G.B.; REMINGTON, J.S. Toxoplasma myocarditis and polymyositis in patients with acute acquired toxoplasmosis diagnosed during life. **Clin Infect Dis.** 24: 676-83, 1997.
- MORRIS, M. T., COPPIN, A., TOMAVO, S., AND CARRUTHERS, V. B. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. **J. Biol. Chem.** 277: 45259–45266, 2002.
- NAKAAR, V., NGO, H. M., AARONSON, E. P., COPPENS, I., STEDMAN, T. T., AND JOINER, K. A. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. **J. Cell Sci.** 116: 2311–2320, 2003.
- NAKAAR, V., SAMUEL, B. U., NGO, E. O., JOINER, K. A. Targeted reduction of Nucleoside Triphosphate Hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. **J. Biol. Chem.** 274 (8): 5083-5087, 1999.
- NAVIA, B.A.; PETITO, C.K.; GOLD, J.M. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome. Clinical and Neuropathological findings in 27 patients. **Ann Neurol.** 19: 224-238, 1986.
- NETO, E.C.; ANELE, E.; RUBIM, R. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-yr prospective neonatal screening study. **Int.J.Epidem.** 29: 941-947, 2000.
- NIELSEN, H.V., SCHMIDT, D.R., & PETERSEN, E. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Two-Dimensional Immunoblot Differentiation of Mother and Child Immunoglobulin G Profiles **J. Of Clinical Microbiology**, 43 (2): 711–715, 2005.
- NÓBREGA, M. C., MAGALHÃES, V., ALBUQUERQUE, Y., MAGALHÃES, C., ARCOVERDE, C. Toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da

UFPE. **RBM – Ginecologia e Obsterícia**. 56, 1999.

NOBREGA, M.C. ET AL. Toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no hospital das clínicas da UFPE. Disponível em <http://www.aguia.redes.ufpe.br/prova1997.htm>. Acesso em 17 mar. 2002.

O'FARRELL, P. H. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** 250: 4007_4021, 1975.

O'FARRELL PZ, GOODMAN HM, electro-phoresis bidimensionais de alta resolução de O'Farrell PH (de básico as well as proteínas acidic. *Pilha* 12: 1133-1142, 1977.

ORÉFICE, F., BONFIOLI, A. Toxoplasmose. in **Uveíte Clínica e Cirúrgica**, Org: Fernando Oréfice, Cultura Médica, Rio de Janeiro – RJ, pp: 620-678, 2000.

ORTEGA-BARRIA E, BOOTHROYD JC. A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. **J Biol Chem** 274:1267–1276, 1999.

PABA, J., SANTANA, J. M., TEIXEIRA, A. R., FONTES, W., SOUSA, M. V., AND RICART, C. A. Proteomic analysis of the human pathogen Trypanosoma cruzi **Proteomics** 4: 1052–1059, 2004.

PACKER, N.H.; WILKINS, M.R.; GOLAZ, O.; LAWSON, M.A. ; GOOLEY, A.A.; HOCHSTRASSER, D.F. REDMOND, J.W.; WILLIAMS, K.L. **Biotechnology** 14 :66, 1996.

PATTERSON, S.D., AEBERSOLD, R., GOODLETT, D.R., Mass spectrometrybased methods for protein identification and phosphorylation site analysis. In: Pennington, S.R., Dunn, M.J. (Eds.). **Proteomics**. From protein sequence to function, Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, pp. 87–130. 2001.

PORTELA, R.WD.; BETHONY, J. ; COSTA, M.I.; GAZZINELLI, A.; VITOR, R.W.A.; HERMETO, F.M.; CORREA-OLIVEIRA, R. GAZZINELLI, R.T. A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis and levels of glycoinositolphospholipid-specific immunoglobulin a. **J Infect Dis.** 190: 175-183, 2004.

PORTER, S.B. & SANDER, M.A. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med.** 327: 1643-1648, 1992.

PRIGIONE I, FACCHETTI P, LECORDIER L, DESLE'E D, CHIESA S, CESBRON- DELAUW MF, PISTOIA V. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. **J Immunol.** 164:3741–8, 2000.

PSZENNY, V., LEDESMA, B. E., MATRAJT, M., DUSCHAK, V. G., BONTEMPI, E. J., DUBREMETZ, J. F., AND ANGEL, S. O. Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from Toxoplasma gondii. **Mol. Biochem. Parasitol.** 121; 283–286, 2002.

REICHMANN, GABY., DLUGON'SKA, H.; FISCHER, H.G. Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone.

Molecular & Biochemical Parasitology 119 43–54, 2002.

REISS, M., VIEBIG, N., BRECHT, S., FOURMAUX, M. N., SOETE, M., DI CRISTINA, M., DUBREMETZ, J. F., AND SOLDATI, D. Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. **J. Cell Biol.** 152: 563–578. 2001.

REMINGTON J. S.; ARAUJO, F.G. & DESMONTS, G. Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. **Journal of Infectious Diseases.** 152: 1020-24, 1985.

REMINGTON J. S.; McLEOD, DESMONTS, G Toxoplasmosis. In: **Remington, j.s.; Klein, j. eds.** Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 4th edn. Philadelphia: W.B. Saunders. Co. 1994.

REMINGTON J. S.; McLEOD, R. THULLIEZ, P. DESMONTS, G Toxoplasmosis. In: **Remington, j.s.; Klein, j. eds.** Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 5th edn. Philadelphia: W.B. Saunders. 205-346, 2001.

REMINGTON JS, MCLEOD R, DESMONTS G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 4th ed. **Philadelphia:** WB Saunders,. pp. 140±267,1995.

REMINGTON, J. S., THULLIEZ, P., MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of Toxoplasmosis. **J. Clin Microbiol.** 42 (3): 941-945, 2004.

REY, L. Toxoplasmose in: **Bases da Parasitologia Médica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 2^a ed, pp: 102 -111, 2002.

ROBIBARO B, HOPPE HC, YANG M, COPPENS I, NGO HM, STEDMAN TT, PAPROTKA K, JOINER KA Endocytosis in different lifestyles of protozoan parasitism: role in nutrient uptake with special reference to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.** 31:1343–2353, 2001.

SABIM, A. B. & FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators as a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science** 108: 160-165, 1948.

SÁFADI, M. A. P., Toxoplasmose. **Pediatr. Mod.** 36 (1/2): 7 – 16, 2000.

SHEVCHENKO, A., JENSEN, O.N., PODTELEJNIKOV, A.V., SAGLIOCCO, F., WILM, M., VORM, O., MORTENSEN, P., SHEVCHENKO, A., BOUCHERIE, H., MANN, M., Linking genome and proteome by mass spectrometry largescale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 93: 14440–5, 1996.

SHIRLEY MW. COST 820 - Vaccines against animal coccidiosis. 5.4. Working group 4, sarcocystiosis, toxoplasmosis, neosporosis, Luxembourg: Of®ce for Of®cial Publications of **the European Communities**,.92-827-8511-4, 1997.

SIBLEY, L.D.; Intracellular parasite invasion strategies. **Science** 304:248–253, 2004.

SIBLEY, L.D.; BOOTHROYD, J.C. Virulente strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature.** 359: 82-85, 1992.

SINAI, A. P., AND JOINER, K. A. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles

Annu. Rev. Microbiol. 51, 415–462, 1997.

SOLDATI, D., AND MEISSNER, M. Toxoplasma as a novel system for motility **Curr. Opin. Cell Biol.** 16: 32–40, 2004.

SOUSA, S.; AJZENBERG, D.; CANADA, N.; FREIRE, L.; COSTA, J.M.; DARDE, M.L.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J.P. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. **Vet Parasitol.** 30: 133-6, 2006.

SPALDING, S. M., AMENDOEIRA, M. R. R., RIBEIRO, L. C., SILVEIRA, C., GARCIA, A. P., CAMILLO-COURA, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de Toxoplasmose Congênita em município do Rio Grande do Sul. **Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.** 36 (4): 483-491, 2003.

STAGNO, S.; SYKES, A.C.; AMOS, C.S. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. **Pediatrics.** 65: 706-712, 1980.

STEPICK-BIEK, P. THULLIEZ, P.; ARAUJO, F.G.; REMINGTON, J.S. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. **J Infect Dis.** 162: 270-273, 1990.

SUZUKI, Y., RAMIREZ, R., PRESS, C., LI, S., PARMLEY, S., THULLIEZ, P., AND REMINGTON, J. S. Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women. **J. Clin. Microbiol.** 38: 3967–3970, 2000.

TENTER AM, SEINEKE P, SIMON K, et al. Aktuelle Studien zur Epidemiologie von Toxoplasma-infektionen. In: Conraths FJ, Greiner M, Kreienbrock L, Schnieder T, et al., editors. Neuere Methoden und Ergebnisse zur Epidemiologie von Parasitosen. DVG, **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. Gießen**: Offset Koehler KG, 3-930511-74-6, 1999.

TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.** 30: 1217-1258, 2000.

TEUTSCH, S.M.; JURANEK, D.D; SULZER, A.; DUBEY, J.P.; SIKES,R.K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **New Engl J Med.** 300: 695-699, 1979.

VAN KNAPEN F, KREMERS AFT, FRANCHIMONT JH, NARUCKA U. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in the Netherlands: towards an integrated control of livestock production. **Vet Q**;17:87±91, 1995.

VERCAMMEN M, SCORZA T, HUYGEN K, DE BRAEKELEER J, DIET R, JACOBS D, SAMAN E, VERSCHUEREN H. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infect Immun.** 68:38–45, 2000.

WALTON B.C. Seroepidemiology of toxoplasmosis. **J Parasitol** 57: 115-120, 1971.

WILKINS, M.R. PASQUALI, C. APPEL, R.D. K. OU, O. GOLAZ, J.-C. SANCHEZ, J.X. YAN, A.A. GOOLEY, G. HUGHES, I. HUMPHREY-SMITH, K.L. WILLIAMS, D.F.

HOCHSTRASSER. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology** .14 : 61-5, 1996.

WOJTEK P. MICHALSKI, BRIAN J. SHIELL. Strategies for analysis of lectrophoretically separated proteins and peptides **Analytica Chimica Acta**. 383: 27±46, 1999.

WONG, S.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clin Infect Dis**. 18: 853-62, 1994.

XING W. ZHOU, BJÖRN, F. C. KAFSACK, ROBERT N. COLE, PHIL BECKETT, RONG F. SHEN AND VERN B. CARRUTHERS The Opportunistic Pathogen *Toxoplasma gondii* Deploys a Diverse Legion of Invasion and Survival Proteins. **The Journal Of Biological Chemistry**. 280 (40): 34233–34244, 2005.

YATES, .R. 3RD; MCCORMACK, A.L., Eng J. Mining genomes with MS. **Anal. Chem**. 68 :534A-540, 1996.

Proteomic Study of Ocular Toxoplasmosis Markers

Gomes-Leitão, M.C.¹, Chaves, M. E.C.^{1,2}, Ferreira, S.^{1,3}, Rádis-Baptista, G.^{1,2},
Porto, A. L.F.¹, Malagueño, E., Gaete, M. I. L.⁴, Lima Filho, J. L.^{1,2*}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

²Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Deptº. de Bioquímica, Recife, PE, Brasil.

³Universidade de Pernambuco (UPE), Deptº. de Patologia, ICB, Recife, PE, Brasil.

⁴Universidade de Pernambuco (UPE), Deptº. de Oftalmologia, Recife, PE, Brasil.

⁵Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Fisiologia.

Abstract

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) is one of the main causing agents of Active posterior uveitis presumably due to *Toxoplasma gondii* infection (APUPT) in different parts of the world. The infection predominates in young people, in the second and third decade of life and is considered the major cause of loss of the visual acuity and blindness. The diagnosis to active toxoplasmosis in patients with ocular toxoplasmosis it is fairly difficult. Serologic exams provide valuable information to distinguish the etiologic diagnosis of this disease, but more frequently cannot be ascertained. The parasite causes latent infection. Some proteins currently identified through conventional molecular biology, and used as markers do not discriminate between active and chronic toxoplasmosis, what make difficult the therapeutic intervention in the adequate moment. Previous studies improved the diagnosis of congenital toxoplasmosis using two-dimensional immunoblotting (2DIB). We developed a 2DIB method with tachyzoite antigen of *T. gondii* RH strain to investigate differentiation between IgA and IgG antibodies response to *T. gondii* using sera from patients with and without APUPT. 68% the antigenic proteins were recognized specifically by the IgA antibodies present in the UPAPT patients sera. Our data suggest that these antigenic protein can be used as possible markers in the diagnosis of active ocular toxoplasmosis.

- Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Immunopatologia Keizo Assami - LIKA (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, University Campus, s/n -50732-901, Recife, PE, Brazil. Phone: 55 81 21012504. Fax: 55 81 21268485. Email: zeluiz60@gmail.com.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) is the main causing agent of the posterior uveitis in different parts of the world.(13) The ocular infection (ocular Toxoplasmosis) caused for this parasite, represents in Brazil, about 50 to 80% of total uveítis (13, 18). The ocular toxoplasmosis disease can come from a congenital infection, resultant of the reactivation of latent infection, or post-nattily acquired, include individuals with acute infection (14, 8). The infection predominates in young people, in the second and third decade of life and is considered the major cause of loss visual acuity and blindness (7).

Diagnosis of ocular toxoplasmosis is frequently based in typical clinical aspects, as the presence of an active white-yellowish lesion with pigmented scar and pericasvulitis. However, other microorganisms can lead to the same clinical aspects. The laboratorial diagnosis helps in distinguishing the etiological agents of these lesions (13).

At the moment, serologic tests are the main laboratorial tool in the diagnosis of the toxoplasmosis, however, it present difficulties in discriminating between the toxoplasmosis active and the chronic. Due to the gravity and irreversibly of the ocular lesions caused by *T. gondii*, the precocity diagnosis of this infection is of great value to an appropriate therapeutic intervention at the adequate moment (1, 11).

The IgA antibody has been suggested as an important marker of acute phase of toxoplasmosis, due to the increased levels in of toxoplasmosis acute and congenital systemic. In the acute phase of Toxoplasmosis, both IgA and IgM antibodies increase in the patient sera, nevertheless the IgA antibodies level are not detectable 6 to 8 months after the infection, being considered a good marker of the acute phase of the disease (2). In several studies in individuals with ocular toxoplasmosis, the sera IgA amount was a good marker of active phase, presenting an increase of levels in individuals with UPAPT (12).

The specific antigenic protein identification of each evolutionary phase of the *T. gondii*, and consequently, of each phase of the infection has been studied through proteomic analysis. More recently, the proteomics studies has grant subsidy to the comprehension of the pathogenesis of the toxoplasmosis, to the protein identification of transitional state from bradyzoites to tachyzoites and to the knowledge of the mechanisms in the host immune response against the infection (4, 20).

Proteomics studies using "two-dimensional immunoblotting" (2DIB) was successfully used in the diagnosis of the congenital toxoplasmosis, identifying the different profiles of the IgG antibodies from sera samples of mothers, sera converted during the pregnancies, and sera of their children. These studies showed different profile of antigenic proteins recognized by IgG antibodies between the sera from mothers and children. With these results the authors suggested the use of the 2DIB, as a new tool in the diagnosis of the congenital toxoplasmosis (15).

In the present work, we developed a two-dimensional immunoblotting (2DIB) to identify *T. gondii* antigenic proteins recognized by IgA and IgG antibodies in the sera from patients with and without APUPT and so to identify the antigenic proteins recognized specifically for IgA antibodies present in the patients sera with APUPT.

MATERIALS and METHODS

Patients - Three patients with APUPT diagnostic through of indirect binocular ophthalmologic examination at the Eye Clinic of the Hospital das Clínicas, in the Federal University of Pernambuco, Brazil. All patients presented high levels of IgG and IgA antibodies against *T. gondii*.

Control subjects. Three individuals without APUPT were chosen among healthy volunteers, with no ocular lesions and IgG reactive to *T. gondii*.

All samples sera were evaluated with ELISA to IgG (Captia *Toxoplasma gondii* IgG) and the IgA antibodies according to Leitão et al. (12). Immunofluorescence was used to assay the IgM antibodies which presented results negative in all samples.

2DIB antigen preparation. *T. gondii* RH strain tachyzoites from mice peritoneal cavity were collected on the 4th day of the infection with PBS 0.01 M pH 7.2, centrifuged at 1,000 X g and the pellet was washed twice, following the method described by ASAI et al. (3). The tachyzoites were sonicated (Vibracell Branson - Model CV17) a 40W, in the frequency of 50MHz, for 20s in ice bath. This procedure was repeated six times, followed by two rounds of freeze-thawing at -80°C per 30 minutes each. In addition, the material was freeze by nitrogen liquid and defrosted to the room temperature (2x) and centrifuged at 7,500 X g for 30 minutes. The supernatants (crude extract) was collected, aliquoted and stored at -80°C until use.

Separation of antigen by two-dimensional immunoblotting. Twelve 7cm Immobiline Drystrips, pH 4-7, were hydrated with 9 M Urea, 2% CHAPS{3-[(3cholamidopropyl) - dimethylammonium]-1-propanesulfonate}, 1% dithiothreitol, 2% IPG buffer and 0.002% bromofenol and 400µg of proteins from the crude extract of *T.gondii*.

The first dimension was carried out in a Multiphor II electrophoresis system (Amersham Biociences). The separation process was in accordance with protocol described in the manual 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients - STENSTEDT et al (19). For the second dimension was used 10% SDS-PAGE and the separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes during 1h and 30 min, at 450 mA, in a Bio-Rad 65 system. All the reagents and equipment were the Amersham Biociences, except when mentioned.

Detection of the antibodies IgA and IgG. Each membrane was cut preserving the area exposed to the Immobiline Drystrip, blocked for 16 h at 4°C with buffer TBS-Tween (0.1%, 0,067M, pH 7,4, and casein 2,5%). Next, the membranes were incubated with diluted sera 1:100 in casein 1% for 2h, at 37°C, washed three times with TBS-Tween for 10 min, and incubated with IgG or IgA anti-human biotins (Aldrich Sigma), for another hour. After washing three times with TBS-Tween, the membranes were incubated with the Streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma Aldrich) during 1 h. The spots were developed with TMB (3,3,5,5-Tetramethylbenzidine) as substrate for 5 min.

Analysis the images. The 2DIB were analyzed by program Image Master TM (2D Platinum software of the Amersham Biociences). The profiles of the *T. gondii*-specific IgA and IgG antibodies from the patients with and without APUPT were studied by Auto-Match Gel, originating synthetic gel (analytical gel). Each analytical gel was formed from the gel consensus, containing the pairs of proteins common to the three sera.

RESULTS

Figure 1 shows the analytical gels of the proteins recognized by anti-*T. gondii* IgA antibodies from sera of the patients with APUPT (**Figure 1a**). In these gels, 62 pairs of proteins were identified by the IgA antibodies, while 28 pairs of proteins were present in the sera of the individuals without APUPT (**Figure 1b**). The anti-*T.gondii* IgG antibodies from sera of the patients with APUPT recognized 77 pairs of proteins(**Figures 1c**) and the sera of the individuals without APUPT 28 pairs of proteins(**Figures 1d**).

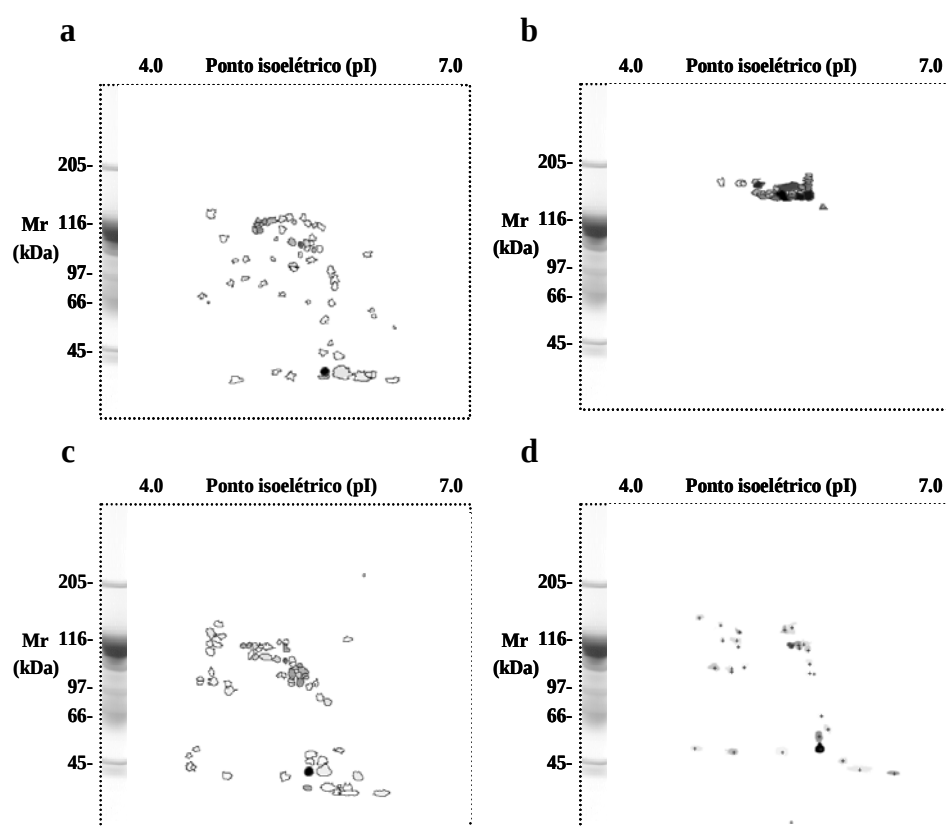


Figure 1. Analytical gels of the two-dimensional immunoblotting (2DIB). Proteins recognized for anti-*T. gondii* IgA antibodies from the sera of individuals with APUPT (**a**) e without APUPT (**b**) and proteins recognized for anti-*T. gondii* IgG antibodies from the sera of individuals with APUPT (**c**) e without APUPT (**d**).

The profile the IgA antibodies (**Figure 2a**) was compared between two groups (with and without APUPT) and only 8 (14%) pairs of similar proteins were recognized. When the profile the IgG antibody (**Figure 2b**) was compared between the same groups, 27 (49%) pairs of similar proteins were recognized. In an attempt to identify the antigens recognized exclusively by the IgA or IgG antibodies from sera of the individuals with APUPT, the pairs of proteins in common were excluded.

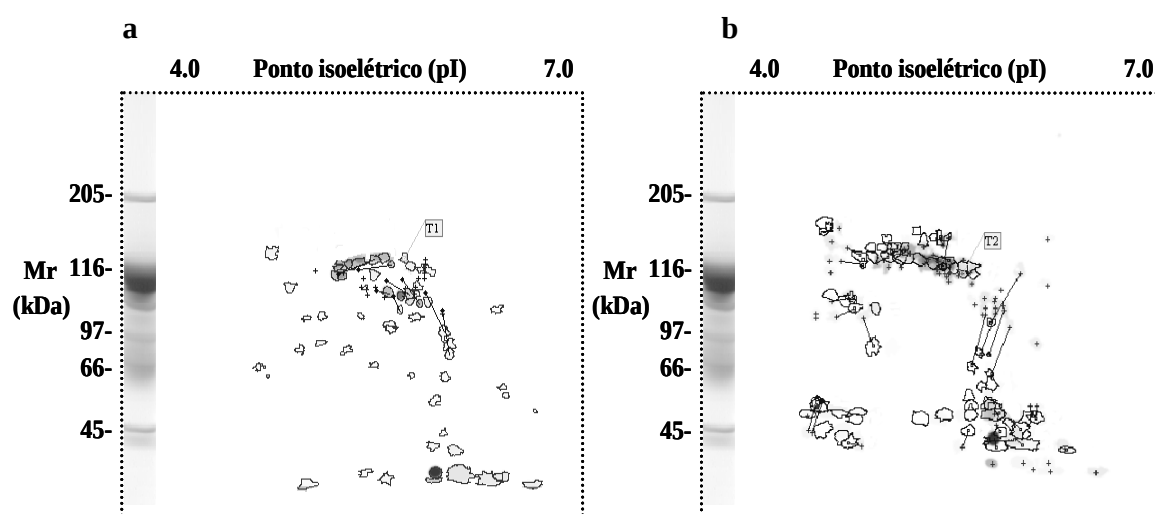


Figure 2. Gels analytical of the 2DIB from patients with APUPT (outlined-spots) and individuals without APUPT (crossed-spots). **a)** proteins recognized to IgA antibodies and **b)** proteins recognized to IgG. antibodies.

Figure 3 is the result of the comparison between analytical gels of proteins recognized by the IgA(outlined-spots) and IgG (crossed-spots) antibodies present in the sera of patients with APUPT. Twelve proteins were recognized in common (24%) for both antibodies with an apparent molecular mass below of 116 kDa and above of 29 kDa.

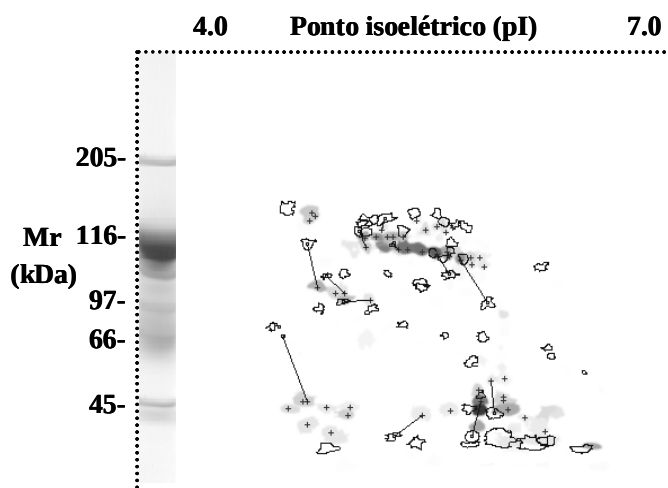


Figure 3. Comparison of analytical gels of 2DIB from patients with APUPT. Proteins recognized by IgA antibodies (outlined-spots) and proteins recognized by IgG antibodies

The Figure 4a shows the proteins recognized exclusively by the IgA antibodies (42 proteins) in the patients with APUPT, while the Figure 4b demonstrates the profile obtained with the IgG antibodies (38 proteins), whose apparent molecular mass varied between 29 and 130 kDa.

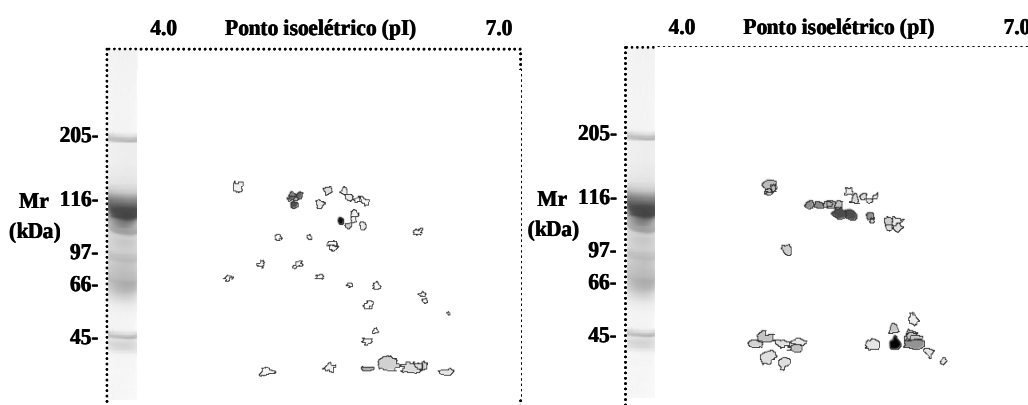


Figure 4. Gels analytical of 2DIB of the proteins recognized for antibodies from the sera of patients with APUPT. (a) proteins exclusively recognized for IgA antibodies and (b) the proteins exclusively recognized for IgG antibodies

DISCUSSION

The initial diagnosis of the ocular Toxoplasmosis is realized by the ophthalmologist, based in the typical aspects of the ocular lesions. However, the retinocoroiditis can come from other agents, beyond the *T. gondii*, resulting many times in an inconclusive diagnosis and delaying clinical the behavior adjusted. Just now, the serological examinations are used as a basic tool in the diagnosis of the disease, but such diagnosis do not identify specific antigen of the evolutionary phases of the *T. gondii* and the type of the strains. In this way, it do not clarify the illness phase of the patients.

Until now, antigenic proteins markers of the *T. gondii* to the active phase of the ocular toxoplasmosis were not identified by proteomic analysis. The identification these proteins are restricted the routine molecular analysis, which do not allow the specific protein identification for each phase of the infection.

The *T. gondii* presents an extraordinary population structure that consists of three predominant clonal strains called I (RH and GT-1), II (ME49) and III (CEP and VEG) (10, 17) the three strains present large geographic distribution and can infected some animal species including the man. Studies done in mice demonstrated that strains of type I are highly virulent, while of types II and III are relatively avirulents (9). Predominant strains in human are of type I and II and in the animals type III.(9, 5) The strains of type I are associated with the most serious cases of resistant ocular injuries to therapy.⁶

For the identification of antigenic proteins of active phase of the ocular toxoplasmosis, the present study used as serological marker the IgA antibody. The IgA antibody has been pointed as an important marker of active phase of the toxoplasmosis ocular (13, 12). , while for IgM antibodies in the same conditions are negative (16).

Studies proteomics using 2DIB comes successfully assisting the diagnosis of the congenital toxoplasmosis. The 2DIB was a methodology that have showed thousand proteins,

promoting an increase of the antigenic protein recognition for antibodies (15). Moreover, the proteomic analysis allied to the immunodiagnostic, either in the detection of immunoglobulins or in the production of monoclonal antibodies will be able to make possible the identification of the illness phase where the patients are found, as well as in the identification of therapeutic target.

When we compare the profile the IgG antibodies among patients with APUPT and without APUPT, these recognize 49% of proteins in common, suggesting that the recognized proteins are of latent phase, because they were also recognized by the sera of individuals infected with the parasite, but that do not present ocular lesions. However, when we compare the profile of the IgA antibodies between the two groups, only 14% of the total proteins were identified in both gels, standing out the idea of a bigger activation of the IgA antibody in the active phase of the ocular toxoplasmosis. These data corroborate with the studies carried out by Leitão et al, (12), which demonstrated an increase of the IgA in the sera of individuals with reactivation of the ocular toxoplasmosis.

Our study has also identified specific antigenic protein for IgA and IgG anti-T. gondii antibodies of the individuals with APUPT using 2DIB. 68% the antigenic proteins were recognized specifically by the IgA antibodies present in the UPAPT patients sera. Our data suggest that these antigenic protein can be used as possible markers in the diagnosis of active ocular toxoplasmosis.

REFERENCES

1.	ABREU MT, BELFORT JR R, ORÉFICE, F. 1987. Toxoplasmose Ocular. In: Oréfice F, Belfort Jr R (eds) Uveítes, Roca, São Paulo, p. 211-230.
2.	AMENDOEIRA, M. R. R. 2001 Diagnóstico de la Toxoplasmosis Congênita. Rev. Cubana Invest. Biomed. 20 (2): 118-121.
3.	ASAI, T., KIM, T., KOBAYASHI, M., KOJIMA, S. 1987. Detection of Nucleoside Triphosphate Hydrolase as a Circulating antigen in sera of mice infected with <i>Toxoplasma gondii</i> . Infect. Immun. 55 (5): 1332-1335.
4.	COHEN, A. M., RUMPEL, K., COOMBS, G. H., WASTLING, J. M. 2002. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomic of <i>Toxoplasma gondii</i> . Int. J for Parasitol. 32: 39-51.
5.	DUBEY, J.P.; GAMBLE, H.R.; HILL, D. SREEKUMAR, C.; ROMAND, S.; THUILLIEZ, P. High prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> infection in market Eight pigs from a farm in Massachusetts. J Parasitol. 88: 1234.
6.	GRIGG, M.E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J.C.; MARGOLIS, T.P. 2001. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J Infect Dis 184: 633-639.
7.	HINRICHEN, L.S.; VALENTE, A.; ROLIM, A.; JUCÁ, M. 2005. In: Doenças Infecciosas e parasitárias-DIP. Edt. Guanabara Koogan. 424-429.
8.	HOLLAND, G.N.; O'CONNOR, G.R.; BELFORT, R. Jr. REMINGOTN, J.S. 1996. Toxoplasmosis, In: Pepose JS.; HOLLAND, G.N.; WIHELMUS, K.R. EDS. Ocular infection and immunity. St. Louiz: Mosby Yearbook, 1183-223.
9.	HOME, D.K.; SIBLEY, L.D. <i>Toxoplasma gondii</i> comprises three clonal inagens: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 172: 1561.
10.	KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C. MACKEY, A.J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I.T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J.C.; PFEFFERKORN, E. R. DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROOS, D.S.; WOOTTON, J.C. AND SIBLEY, L.D. 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of <i>Toxoplasma gondii</i> 2980–2992 Nucleic Acids Research, Vol. 33, No. 9 :10.1093/nar/gki604.
11.	KUSSENHLATT, R.B.; BELFORTO Jr. R. 1994. Ocular Toxoplasmosis: An old disease revisited. Journal of Americam Medical Assciation. 271: 304-307.
12.	LEITAO, M.C.G.; MALAGUENO, E.; FERREIRA, S.F.S. 2003. Avaliação de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA em soros de indivíduos infectados pelo <i>Toxoplasma gondii</i> , com a forma ocular da doença. (Biológicas) Bib. Ciências Biológicas. BL 259, p.32.
13.	LYNCH, M. I., CORDEIRO, F., FERREIRA, S., XIMENES, R., ORÉFICE, F.,

	MALAGUEÑO, E. 2004. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveitis induced by <i>Toxoplasma gondii</i> . Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99 (8): 861-864.
14.	MONTOYA JG, REMINGTON JS. 1996. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. Clinical Infectious Diseases 23: 277-282.
15.	NIELSEN, H.V., SCHMIDT, D.R., & PETERSEN, E. 2005. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Two-Dimensional Immunoblot Differentiation of Mother and Child Immunoglobulin G Profiles J. Of Clinical Microbiology, 43 (2): 711–715.
16.	ORÉFICE, F., BONFIOLI, A. 2000 Toxoplasmose. in Uveíte Clínica e Cirúrgica, Org: Fernando Oréfice, Cultura Médica, Rio de Janeiro – RJ, pp: 620-678.
17.	SAEIJ, J.P.J.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. 2005. Differences among the three major strains of <i>Toxoplasma gondii</i> and their specific interactions with the infected host. Trends in Parasitology. 21:476-481.
18.	SÁFADI, M. A. P. 2000. Toxoplasmose. Pediatr. Mod. 36 (1/2): 7 – 16.
19.	STENSTEDT, T.B.; BJELLQVIST, B.; LAIRD, N.; McDOWEL, M.; OLSSON, I.; WESTERMEIR, R. 2002. 2-D Electrophoresis-Principles end methods. 80:6429-60.
20.	ZHOU, X. W., BLACKMAN, M. J., HOWELL, S. A., CARRUTHERS, V. B. 2004. Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex. Mol. Cell. Prot. 3.6: 565-575.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO

A infecção pelo *T. gondii* apresenta uma ampla distribuição mundial, além , de uma soropositividade em cerca de 20 a 90% da população mundial. A toxoplasmose ocular pode ser ocasionada tanto em indivíduos imunocompetentes, como em indivíduos imunocomprometidos, e ainda pode ser uma manifestação clínica da toxoplasmose congênita. Em todos estes casos a lesão ocular poder resultar em perda parcial ou completa da visão destes indivíduos.

O diagnóstico da toxoplasmose ocular é baseado primeiramente através de identificação da lesão ocular por oftalmologistas, que pode ter como etiologia o *T. gondii*. Entretanto o diagnóstico só é confirmado por exames laboratoriais. Atualmente o diagnóstico da toxoplasmose oculae é baseado na pesquisa de anticorpos produzidos frente o parasito, através de ELISA e imunofluorescência. Todavia, estes testes, geralmente, utilizam o extrato de antígenos totais do parasito, desta forma, a especificidade destes testes pode ser aprimorada através da utilização de antígenos mais específicos. Este trabalho iniciou o estudo das proteínas do *T. gondii*, utilizando ferramentas proteômicas (eletroforese 2-D e Western blotting), que induzem a resposta humoral, em indivíduos que apresentam a uveíte posterior ativa, ou seja, que estão em fase ativa de infecção pelo parasito.

As cepas da linhagem I e II são as que parasitam o homem. O presente estudo utilizou a cepa de linhagem I (RH), que é responsável pelos casos mais graves de lesões oculares.. Além disso, o estudo identificou proteínas que além de serem, em sua maioria, especificamente reconhecidas por indivíduos com UPAPT, ainda são específicas reconhecidas para o anticorpo IgA, que já vem sendo apontado como um bom marcador de fase ativa da infecção.

Desta forma, a identificação de proteínas sugeridas como marcadoras da fase ativa da toxoplasmose ocular, irá promover um diagnóstico mais específico da infecção. Resultando na possibilidade de aplicação de tratamento adequado, e em tempo viável, que poderá minimizar as lesões oculares causadas pelo *T. gondii*.

Este trabalho visa, a utilização de um número maior de indivíduos, para confirmar os resultados obtidos, como também, realizar o sequenciamento das proteínas através deste identificadas, utilizando para isto a espectrometria de massa (MALDI-Tof), e por conseguinte a pesquisa destas seqüências em bancos de dados do *T. gondii*.

9. INDICADORES DE PRODUÇÃO

Prêmios e Títulos

2005 Samuel Pessoa (Menção honrosa), Sociedade Brasileira de Parasitologia.

Artigos completos publicados em periódicos

1.
Lynch, M. I., Cordeiro, F., Ferreira, S., Ximenes, Oréfice, F., Malagueño , E.
Lacrimal Secretory IgA in active posterior uveitis induced by toxoplasma gondii. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.: , v.99, n.8, p.861 - 864, 2004.

Palavras-chave: Toxoplasmose Ocular, Imunologia, Sorologia

Áreas do conhecimento: Imunologia, Parasitologia

Setores de atividade: Cuidado à saúde das populações humanas

Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
Colaboração na qualidade de apoio Técnico.

Artigos submetidos à publicação em periódicos

1.
Ferreira, S., Porto, A. L. F.; Malagueño , E.; Kobayashi, M; T, Asai; Albuquerque,B.F.;
Gomes Leitão; Lima Filho, J.L.
Purification of the monoclonal antibody anti-NTPase of *Toxoplasma gondii* aqueous two-
phase system PEG-phosphate. Journal chromatography B,2005.

Palavras-chave: Toxoplasmose Ocular, Imunologia, Sorologia

Áreas do conhecimento: Imunologia, Parasitologia

Setores de atividade: Cuidado à saúde das populações humanas

Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

1. Ferreira, S.; Kobayashi, M; Malagueño , E.; Porto, A. L. F.; Gomes Leitão; Lynch, M. I.;
Lima Filho, J.L. DETECÇÃO DE NTPASE DE TOXOPLASMA GONDII EM
INDIVÍDUOS COM A FORMA OCULAR DA DOENÇA (Apresentação oral) In: XIX
CONGRASSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA. Porto Alegre.

Anais do XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia. , 2005.

Palavras-chave: Imunologia, Toxoplasmose

Áreas do conhecimento: Imunologia, Toxoplasmose

Setores de atividade: Cuidado à saúde das populações humanas

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Trabalho premiado com Menção honrosa.

Trabalhos Técnicos

1.

Gomes-Leitão, M. C.

Utilização de anticorpo monoclonal (anit-NTPase) para diagnóstico da Toxoplasmose, 2004

Palavras-chave: Imunologia, Toxoplasmose, Sorologia

Áreas do conhecimento : Imunologia,Parasitologia

Setores de atividade : Produtos e processos biotecnológicos, Cuidado à saúde das populações humanas

Referências adicionais : Brasil/Português.

Participação no projeto na qualidade de bolsista. Bolsa de Fixação de Técnico-BFT-0199-2.11/, período de 01.11.03 a 31.10.04.

Participação em eventos

1.

Gomes-Leitão, M. C.

I Jornada Científica do LIKA, 2005. (Outra, Participações em eventos)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2.

Gomes-Leitão, M. C.

X Curso Internacional sobre Doenças Tropicais, 2005. (Outra, Participações em eventos)

Palavras-chave: Amebíase, Sorologia, Imunologia

Áreas do conhecimento: Imunologia,Parasitologia

Setores de atividade : Cuidado à saúde das populações humanas

Referências adicionais : Brasil/Português.

Participação na condição de monitora pelo tópico de "Amebíase".

3.

Gomes-Leitão, M. C.

X Curso Internacional sobre Doenças Tropicais, 2005. (Outra, Participações em eventos)

Palavras-chave: Imunologia, Sorologia, Esquistossomose

Áreas do conhecimento: Imunologia, Parasitologia

Setores de atividade : Cuidado à saúde das populações humanas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Participação na condição de monitora pelo tópico de "Esquistossomose Mansônica".

4.

Gomes-Leitão, M. C.

IX Curso Internacional sobre Doenças Tropicais, 2004. (Outra, Participações em eventos)

Palavras-chave: Toxoplasmose, Sorologia, Imunologia

Áreas do conhecimento: Imunologia, Parasitologia

Referências adicionais : Brasil/Português.

Participação na condição de Monitora pelo tópico de "Esquistossomose Mansônica".

Outras informações relevantes

1.

Aulas ministradas na Disciplina de Parasitologia, Intituladas "Ascaridíase", "Amebíase" e "Doença de chagas", na Universidade de Pernambuco-UPE, para o curso de Odontologia, 2004.

2.

Atualmente faz parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), onde desenvolve atividades no setor de imunologia desde junho de 2001-2003 (Iniciação Científica), E 2004-2005 (Mestranda), nas áreas de Sorologia e Cultura Celular.