

FERNANDA SANTOS NASCIMENTO

**NEUROTOXOPLASMOSE: DIAGNÓSTICO MOLECULAR,
RESPOSTA IMUNE E RELAÇÃO COM TRANSTORNOS
MENTAIS**

CAMPINAS

2012



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**NEUROTOXOPLASMOSE: DIAGNÓSTICO MOLECULAR,
RESPOSTA IMUNE E RELAÇÃO COM TRANSTORNOS
MENTAIS**

Fernanda Santos Nascimento

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas. Sob orientação do Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

N17n

Nascimento, Fernanda Santos, 1980 -
Neurotoxoplasmose: diagnóstico molecular,
resposta imune e relação com transtornos mentais
/ Fernanda Santos Nascimento. – Campinas, SP :
[s.n.], 2012.

Orientador : Cláudio Lúcio Rossi.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Toxoplasmose cerebral. 2. Reação em
cadeia da polimerase. 3. Anticorpos. 4.
Transtornos mentais. I. Rossi, Cláudio Lúcio. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Neurotoxoplasmosis: molecular diagnosis, immune response and relationship with mental disorders.

Palavras-chave em inglês:

Cerebral toxoplasmosis
Polymerase chain reaction
Antibodies
Mental disorders

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Cláudio Lúcio Rossi [Orientador]
José Antonio Livramento
Mirthes Ueda

Sílvia de Barros Mazon

Célia Regina Garlipp

Data da defesa: 02-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Fernanda Santos Nascimento

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Cláudio Lúcio Rossi

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) José Antonio Livramento	
Professor (a) Doutor (a) Mirthes Ueda	
Professor (a) Doutor (a) Sílvia de Barros Mazon	
Professor (a) Doutor (a) Célia Regina Garlipp	
Professor (a) Doutor (a) Cláudio Lúcio Rossi	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/02/2012

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais e marido pelo amor, confiança e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as coisas.

Ao professor Cláudio, pela confiança, apoio e orientação que resultaram neste trabalho.

Aos meus queridos pais, por todo amor, carinho e confiança.

Ao meu querido marido Alexandre, pelo companheirismo, amor, paciência e apoio nos momentos difíceis.

Aos meus grandes amigos, pelas infindáveis razões que os fazem tão importantes na minha caminhada.

Aos companheiros e colegas de laboratório, por toda ajuda e pela indispensável e agradável presença de todos os dias.

À professora Sandra Cecília Botelho Costa e toda equipe do *Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular*, pelo suporte técnico e colaboração.

Aos professores Cláudio Eduardo Müller Banzato e Clarissa de Rosalmeida Dantas, ao residente Lucas F. B. Mella e ao aluno Mário Pincelli Netto, pela colaboração.

Ao Setor de Bioestatística da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela análise dos dados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando no fim terás o que colher.”

CORA CORALINA

RESUMO

A neurotoxoplasmose é considerada uma grave complicação em pacientes com comprometimento do sistema imune e em crianças congenitamente infectadas pelo *Toxoplasma gondii*. O presente estudo abordou três aspectos da neurotoxoplasmose, o diagnóstico molecular, a resposta imune e a relação desta infecção com transtornos mentais. Com relação ao diagnóstico molecular, a eficiência das técnicas de *nested*-PCR (nPCR) e PCR convencional (PCRc) em detectar DNA do *T. gondii* foi avaliada em nove amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com neurotoxoplasmose, cinco amostras de LCR de pacientes com outras desordens neurológicas (dois com neurocriptococose, dois com neurosífilis e um com neurocisticercose) e amostras artificiais contendo diferentes concentrações do parasito. A nPCR foi positiva em todos os nove pacientes com neurotoxoplasmose, enquanto a PCRc foi positiva em somente cinco casos. As duas técnicas de PCR foram negativas em LCR de pacientes com outras desordens neurológicas. Nas amostras artificiais, a concentração de taquizoítos detectada por nPCR foi dez vezes menor do que aquela detectada por PCRc. Para avaliar a resposta imune, anticorpos das subclasses da IgG anti-*T. gondii* foram pesquisados em 19 amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose, utilizando ELISA padronizada com uma preparação antigênica de cistos do parasito. Os anticorpos IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ foram detectados em 84,2%, 73,7%, 36,8% e 36,8% dos pacientes, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas entre as sensibilidades e as médias das absorvâncias das reações ELISA para IgG₁ e IgG₂, porém, as sensibilidades e as médias das absorvâncias das reações para essas duas subclasses foram significativamente maiores do que as encontradas nas reações ELISA para IgG₃ e IgG₄. A associação entre toxoplasmose e transtornos mentais foi investigada comparando as prevalências e/ou as concentrações dos anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, detectados por reações imunoenzimáticas, em amostras de soro de 41 pacientes com esquizofrenia, 38 pacientes com transtornos do humor e 95 voluntários sadios. Os anticorpos IgG foram detectados em 43,9% dos pacientes com esquizofrenia, 52,6% dos pacientes com transtornos do humor e 28,4% dos voluntários sadios. A prevalência da IgG e as concentrações desse anticorpo nos pacientes com transtornos do humor foram significativamente maiores do que as encontradas em voluntários sadios ($p=0,0204$ e $p=0,0059$, respectivamente). Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas nesses dois parâmetros entre pacientes com esquizofrenia e voluntários sadios

ou entre os pacientes com esquizofrenia e transtornos do humor. Os anticorpos IgA foram detectados em um paciente (2,6%) com transtorno do humor e em um (1,1%) voluntário sadio, enquanto os anticorpos IgM foram detectados em dois pacientes (5,2%) com transtornos do humor. O presente estudo indica que a nPCR pode ser uma ferramenta potencialmente útil para a confirmação diagnóstica da infecção do sistema nervoso central pelo *T. gondii* e sugere que esse parasito poderia ser um dos possíveis fatores causais dos transtornos do humor. Estudos adicionais são necessários para compreender melhor a fisiopatologia da neurotoxoplasmose e sua associação com outras doenças.

ABSTRACT

Neurotoxoplasmosis is considered a serious complication in patients with an impaired immune system and in children congenitally infected by *Toxoplasma gondii*. The present study addressed three aspects of neurotoxoplasmosis, namely, the molecular diagnosis, the immune response and the relationship of this infection to mental disorders. With regard to molecular diagnosis, the ability of nested-PCR (nPCR) and conventional PCR (cPCR) to detect *T. gondii* DNA was assessed in nine cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with neurotoxoplasmosis, five CSF samples from patients with other neurological disorders (two with neurocryptococcosis, two with neurosyphilis and one with neurocysticercosis) and artificial samples containing different concentrations of the parasite. The nPCR was positive in all nine patients with neurotoxoplasmosis whereas the cPCR was positive in only five cases. Both PCR procedures were negative in CSF from patients with other neurologic disorders. In the artificial samples, the tachyzoite concentrations detected by nPCR were ten times lower than those detected by cPCR. To assess the immune response, 19 CSF samples from patients with neurotoxoplasmosis were screened for IgG subclass antibodies to *T. gondii* using an ELISA standardized with an antigenic preparation from parasite cysts. IgG₁, IgG₂, IgG₃ and IgG₄ antibody subclasses were detected in 84.2%, 73.7%, 36.8% and 36.8% of the patients, respectively. There were no significant differences in the ELISA sensitivities and mean absorbances for IgG₁ and IgG₂, whereas the sensitivities and mean absorbances for these two IgG subclasses were significantly higher than for IgG₃ and IgG₄. The association between toxoplasmosis and mental disorders was investigated by comparing the prevalences and/or the concentrations of anti-*T. gondii* IgG, IgM and IgA antibodies screened by immunoenzymatic reactions in serum samples from 41 patients with schizophrenia, 38 patients with mood disorders and 95 healthy volunteers. IgG antibodies were detected in 43.9% of patients with schizophrenia, 52.6% of patients with mood disorders and 28.4% of healthy individuals. The prevalence of IgG and the concentration of this antibody in patients with mood disorders were significantly greater than in healthy volunteers ($p=0.0204$ and $p=0.0059$, respectively). In contrast, there were no significant differences in these two parameters between patients with schizophrenia and healthy volunteers, or between patients with schizophrenia and patients with mood disorders. IgA antibodies were detected in one patient (2.6%) with mood disorders and in one (1.1%) healthy volunteer, whereas IgM antibodies were detected in two patients (5.2%)

with mood disorders. The present study indicates that nPCR may be a potentially useful tool for the diagnosis of *T. gondii* infection of the central nervous system and suggests that this parasite could be a possible cause of mood disorders. Further studies are necessary to improve our understanding of the physiopathology of neurotoxoplasmosis and its association with other diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervoso Central
nPCR	Reação em Cadeia da Polimerase tipo <i>nested</i>
PCRc	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
QI	Quociente de Inteligência
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon-gama
NK	Natural Killer
IFI	Imunofluorescência Indireta
TC	Tomografia Computadorizada
RM	Ressonância Magnética
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - IV</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
UV	Ultravioleta
SST	Solução Salina Tamponada
SST-T	Solução Salina Tamponada contendo Tween 20
SST-T-SAB	SST-T contendo Soro Albumina Bovina
TA	Temperatura Ambiente
UI/ml	Unidades Internacionais por ml
UA/ml	Unidades Arbitrárias por ml
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela	PÁG.
1. Dados clínicos, resultados laboratoriais e de neuroimagem dos pacientes com neurotoxoplasmose.....	38
2. Pesquisa das subclasses da IgG anti- <i>T. gondii</i> por ELISA em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose.....	40
3. Resultado da pesquisa de anticorpos IgG, IgM e IgA em pacientes com esquizofrenia, transtornos do humor e voluntários sadios.....	41
4. Média da concentração dos anticorpos IgG e IgA em pacientes com esquizofrenia, transtornos do humor e voluntários sadios.....	41
5. Associação entre os fatores de risco para a toxoplasmose e transtornos do humor.....	42
6. Associação entre os fatores de risco para a toxoplasmose e esquizofrenia.....	42
 Figura	
1. Resultado da pesquisa de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose (NT) e com outras desordens neurológicas (ODN).....	39

	PÁG.
1- INTRODUÇÃO	16
2- OBJETIVOS	28
3- MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1- Pacientes e amostras	31
3.2- Extração de DNA	32
3.3- Técnicas de PCR	32
3.4- Obtenção da preparação antigênica de <i>T. gondii</i> para reações de ELISA	34
3.5- ELISA para detecção de anticorpos das subclasses da IgG	34
3.6- Pesquisa de anticorpos anti-<i>T. gondii</i> em amostras de soro de pacientes com transtornos mentais e voluntários sadios	35
3.7- Análise dos dados	35
4- RESULTADOS	37
4.1- Pesquisa de DNA do <i>T. gondii</i> por nPCR e PCRc	38
4.2- Pesquisa de anticorpos anti-<i>T. gondii</i> das subclasses da IgG em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose	39
4.3- Pesquisa de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-<i>T. gondii</i> em amostras de soro de pacientes com transtornos mentais e de voluntários sadios	40
5- DISCUSSÃO	43
6- CONCLUSÕES	52
7- REFERÊNCIAS	54

1- INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* foi descoberto em 1908, na Tunísia, pelos pesquisadores Nicolle e Manceaux (1) que encontraram o parasito em células do baço e do fígado do roedor *Ctenodactylus gondi*. Independentemente, no mesmo ano, Splendore (2) descreveu o mesmo parasito em coelhos de laboratório em São Paulo. Durante muitos anos, o organismo foi reconhecido como agente etiológico de doença em animais. Em 1923, Janku *apud* Remington et al. (3) encontrou cistos do parasito na retina de uma criança de 11 meses de idade com hidrocefalia e microftalmia. A importância do *T. gondii* como agente patogênico em humanos só foi elucidada em 1937, quando Sabin e Olitsky (4) confirmaram a associação do parasito com encefalite granulomatosa infantil, em um caso previamente descrito por Wolf e Cowen (5). Ao analisar casos de encefalite em crianças recém-nascidas, esses mesmos pesquisadores identificaram o *T. gondii* como causa da doença transmitida congenitamente (6). Em 1940, Pinkerton e Weinman (7) identificaram em um adolescente que faleceu com toxoplasmose disseminada o primeiro caso da infecção adquirida por via não congênita.

Em 1948, Sabin e Feldman (8) desenvolveram o primeiro teste sorológico (teste do corante) para o diagnóstico da infecção pelo *T. gondii*, o que permitiu numerosas investigações epidemiológicas e clínicas, que mostraram que a infecção causada pelo parasito apresentava alta prevalência, sendo assintomática na grande maioria das pessoas.

Em 1960, Jacobs et al. (9) verificaram que as formas císticas do parasito eram resistentes à ação de enzimas digestivas e que a infecção podia ser transmitida para hospedeiros carnívoros pela ingestão dos cistos. Embora as vias congênita e alimentar fossem importantes na transmissão do *T. gondii*, não era conhecido o mecanismo de infecção em indivíduos estritamente vegetarianos e animais herbívoros. Em 1965, Hutchison (10) esclareceu este fato após a descoberta de que as fezes de gatos infectados pelo *T. gondii* podiam conter uma forma resistente do parasito, capaz de contaminar o solo e conseqüentemente os vegetais, causando infecção quando ingerida por seus hospedeiros.

O *T. gondii* apresenta três estágios de desenvolvimento: taquizoíto, bradizoíto e oocisto. O taquizoíto (2 a 4 µm de largura; 4 a 8 µm de comprimento) é a forma intracelular obrigatória que se prolifera na fase aguda da infecção dentro do vacúolo parasitóforo de células hospedeiras (11). Essa forma parasitária é pouco resistente à ação de enzimas digestivas, ao congelamento e à dessecação (12). Os bradizoítos são morfologicamente

semelhantes aos taquizoítos, porém, multiplicam-se lentamente no interior de cistos teciduais e expressam moléculas estágio-específicas (13). Os cistos podem conter de dezenas a milhares de bradizoítos e embora possam se desenvolver em órgãos viscerais como fígado, pulmão e rins, são mais frequentemente encontrados no cérebro, retina e nos músculos cardíaco e esquelético de seus hospedeiros (14,15). Os cistos são mais resistentes à ação de enzimas digestivas do que os taquizoítos e podem manter-se infectantes sob refrigeração (1 °C a 4 °C) em carcaças ou carne picada, por até três semanas, bem como sobreviver ao congelamento (-1 °C a -8 °C) por mais de uma semana. Contudo, temperaturas de -12 °C ou menos, podem inativar os cistos. O aquecimento a 50 °C por 10 minutos ou a 60 °C por 4 minutos não é suficiente para eliminar os cistos, porém o aquecimento a temperaturas de 67 °C ou mais tem sido reconhecido como uma maneira segura de inativar os cistos presentes na carne (16,17). O oocisto, produto da fase sexuada do *T. gondii* que ocorre em membros da família *Felidae*, é eliminado na forma não esporulada (não infectante) no ambiente, juntamente com as fezes desses animais. Durante a infecção aguda, milhares de oocistos podem ser eliminados. O período de esporulação pode variar de 3 a 21 dias, dependendo do grau de aeração, temperatura e umidade do ambiente. Após a esporulação, os oocistos, medindo cerca de 11 a 14 µm de diâmetro e abrigando oito esporozoítos em seu interior, tornam-se infectantes (18). O oocisto esporulado pode resistir à ação de enzimas digestivas e tolerar variações ambientais diversas, podendo manter-se infectante por 18 meses no solo em temperaturas entre -20 °C a 35 °C (19), e até 410 dias em água em temperaturas entre -6 °C a 39 °C (20). O congelamento pode não ser suficiente para matar o oocisto, que pode sobreviver por 28 dias à temperatura constante de -21°C (21). Esta forma do parasito resiste também a agentes químicos, como ácido sulfúrico a 2% e dicromato de potássio a 2,5% por vários anos a 4 °C, além de soluções detergentes e desinfetantes, como hipoclorito de sódio a 5,25% (22). Porém, o oocisto é sensível à radiação gama, atualmente muito utilizada para sua inativação em frutas e vegetais (23,24).

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteroxeno facultativo. Seus hospedeiros intermediários incluem aves e mamíferos e seus hospedeiros definitivos são membros da família *Felidae*, cujo representante mais importante na transmissão da doença para a espécie humana é o gato (*Felis catus*) (14).

Os hospedeiros intermediários e definitivos podem ser infectados pela ingestão de cistos ou oocistos. Nos hospedeiros intermediários, incluindo os felídeos, o parasito realiza seu ciclo sexuado, em que os taquizoítos após infectarem as células hospedeiras, se multiplicam por repetidos processos de endodiogenia, que acarretam na ruptura celular com liberação de parasitos que se disseminam pela corrente sanguínea e infectam inúmeras células de diferentes tipos. A multiplicação do parasito, com conseqüente destruição celular, ocorre até o desenvolvimento da imunidade humoral e celular, resultando na formação de cistos, onde os bradizoítos se multiplicam lentamente por endodiogenia (12,25). Os cistos podem persistir por toda a vida do hospedeiro, entretanto acredita-se que estes se rompam periodicamente, com a transformação de bradizoítos em taquizoítos que infectam novas células e formam novos cistos (3,13,25).

Quando o hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de cistos ou oocistos, os bradizoítos ou esporozoítos liberados no tubo gastrointestinal se transformam em taquizoítos que infectam as células da mucosa gástrica e se multiplicam inicialmente pelo processo assexuado anteriormente mencionado. No interior de células do epitélio intestinal desses hospedeiros, ocorre a gametogonia com diferenciação de taquizoítos em gametas femininos e masculinos, que se fundem formando oocistos. Após o rompimento das células enteroepiteliais os oocistos alcançam a luz intestinal e são eliminados no ambiente junto com as fezes dos animais infectados. No ambiente, o esporonte contido no oocisto divide-se em dois corpos arredondados chamados esporoblastos, que tornam-se alongados formando os esporocistos, os quais abrigam quatro esporozoítos cada (14).

A infecção congênita foi a primeira forma de transmissão do *T. gondii* reconhecida (6). Esta acontece principalmente no curso de uma infecção aguda primária na gestante e como passo fundamental para ocorrência da transmissão vertical, os parasitos precisam multiplicar-se no interior de células placentárias e atingir a circulação fetal (3,26). Alguns poucos casos de transmissão congênita, resultantes de reinfecção ou reativação da infecção latente durante a gestação, são também descritos na literatura (3,27,28).

A infecção toxoplásmica é geralmente adquirida por meio da ingestão de cistos, presentes em carne crua ou mal cozida de animais infectados pelo *T. gondii*, ou de oocistos presentes no solo, água e vegetais contaminados (12,14,25). A ingestão de água não filtrada tem sido responsável por vários surtos de toxoplasmose, inclusive no Brasil (29,30,31).

O contato com solo contaminado por oocistos de *T. gondii* sem a proteção de luvas, principalmente em práticas de jardinagem e limpeza de recipientes onde os gatos eliminam suas fezes, também são fatores de risco importantes para a infecção toxoplásmica (32).

Vários trabalhos relataram o isolamento do *T. gondii* em leite de animais experimentalmente infectados, como camundongos (33), cães, gatos, cabras (34), cobaias, coelhos, carneiros (35) e também em colostro de vacas e porcos naturalmente infectados (36,37). Embora o *T. gondii* tenha sido isolado de leite humano (38), a transmissão por amamentação não tem sido demonstrada na espécie humana (3). Leite não pasteurizado, especialmente de cabra, já foi implicado como veículo de transmissão do *T. gondii* (39,40), sendo a pasteurização comprovadamente importante para a destruição de todas as formas do parasito (23).

Em pacientes transplantados a infecção primária pode ser adquirida quando um receptor soronegativo para o *T. gondii* recebe órgãos sólidos ou medula óssea de um doador soropositivo para o parasito (25,41,42). A transmissão da infecção toxoplásmica via doação de sangue ou leucócitos é raramente descrita (43,44), e alguns casos de infecções decorrentes de acidentes laboratoriais, em profissionais que manipulam agulhas, lâminas e animais infectados, têm sido registrados na literatura (45-47).

Em pessoas imunocompetentes, na maioria dos casos, a infecção pelo *T. gondii* é assintomática. Em torno de 10% dos pacientes, ocorrem sintomas inespecíficos como febre, mal-estar, mialgia, dor de garganta e dor de cabeça que podem estar associados ou não a linfadenopatia (48-50). Miocardite, polimiosite, hepatite, pneumonia e encefalite são manifestações dificilmente observadas em pessoas imunocompetentes (3,49). Em raros casos, as infecções com cepas virulentas podem causar doença grave e fatal mesmo em indivíduos imunocompetentes (29,51).

A toxoplasmose ocular pode ocorrer como uma manifestação tardia da infecção congênita ou no curso da infecção aguda adquirida (49,52,53). A replicação desses parasitos na retina pode induzir necrose e inflamação, causando sintomas como dor, fotofobia e perda de visão. Em um número significativo de pacientes, a toxoplasmose ocular ocorre em diversos episódios recorrentes (50).

A toxoplasmose congênita pode ser assintomática ao nascimento ou causar uma variedade de manifestações clínicas na criança, como hidrocefalia, microcefalia,

calcificações cerebrais, coriorretinite, cegueira, epilepsia, retardo motor, retardo mental e anemia (50,54,55). Sequelas de atraso neurológico, incluindo baixo QI, desenvolvimento psicomotor retardado e surdez neurosensorial, também têm sido demonstradas em crianças que foram expostas ao *T. gondii* no útero, mesmo entre aquelas com infecção subclínica durante o período neonatal (56,57).

Em pacientes imunocomprometidos, com ou sem a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), a toxoplasmose quase sempre ocorre como resultado da reativação de uma infecção latente, sendo o sistema nervoso central (SNC) o sítio mais afetado. A neurotoxoplasmose é considerada uma das complicações mais graves, podendo levar a óbito se não tratada rapidamente após o aparecimento dos sintomas (58, 59, 60). Geralmente, suas manifestações clínicas são dor de cabeça bilateral intensa e persistente, alterações do estado mental com alucinações, déficit motor, distúrbios do nervo cranial, anormalidades sensoriais, desordens de movimento e, mais frequentemente, hemiparesia e distúrbios de fala (49,61,62). Além do comprometimento do SNC, esses pacientes também podem apresentar coriorretinite, pneumonite, miocardite, bem como doença disseminada (3,49).

A resposta imune contra o *T. gondii* é mediada por mecanismos da imunidade inata, celular e humoral. A primeira linha de defesa contra o parasito é realizada por mecanismos da imunidade inata. Após a ingestão de cistos ou oocistos, os bradizoítos ou esporozoítos são liberados no intestino delgado e invadem ativamente os enterócitos. As células infectadas secretam moléculas citotóxicas como óxido nítrico e também quimiocinas que atraem as células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas (63). Essas células, além de apresentarem os antígenos do *T. gondii* aos linfócitos T, secretam IL-12, interleucina capaz de estimular a produção de interferon- γ (INF- γ) pelas células natural killer (NK), linfócitos T CD4+ e T CD8+. O INF- γ é capaz de estimular a atividade fagocítica dos macrófagos resultando na morte dos parasitos fagocitados. A IL-12 é também capaz de ativar as células NK e os linfócitos T CD8+, aumentando sua atividade citolítica sobre as células do hospedeiro infectadas pelo parasito (64). Os anticorpos específicos também contribuem para a proteção na infecção pelo *T. gondii*. A espécie humana possui cinco classes de imunoglobulinas, IgM, IgA, IgG, IgD e IgE. As classes IgA e IgG são constituídas, respectivamente, por duas (IgA₁ e IgA₂) e quatro subclasses (IgG₁,

IgG₂, IgG₃ e IgG₄). Em pessoas adultas saudáveis, a IgG₁ é a imunoglobulina com maior concentração sérica (5-12 g/l), seguida pela IgG₂ (2-6 g/l), IgA₁ (0,5-2 g/l), IgM (0,5-1,5 g/l), IgG₃ (0,5-1,0 g/l), IgG₄ (0,2-1,0 g/l), IgA₂ (0-0,2 g/l), IgD (0-0,4 g/l) e IgE (0-0,002 g/l) (65). A meia-vida das imunoglobulinas IgM, IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgD e IgE é, respectivamente, aproximadamente de 5, 6, 6, 23, 23, 16, 23, 3 e 2 dias (66).

A resposta imune humoral contra o *T. gondii* se desenvolve durante a parasitemia na infecção aguda e é direcionada principalmente contra os taquizoítos. A produção de anticorpos IgM é observada em até dez dias após a infecção, com rápida elevação, alcançando níveis máximos por volta da quarta semana (67). Esses anticorpos são capazes de ativar o sistema complemento que promove a destruição do parasito. Os anticorpos da classe IgG, principal classe de imunoglobulina envolvida na resposta imune humoral contra o *T. gondii* (68), geralmente aparecem depois dos anticorpos IgM, entre a segunda e quarta semana após a infecção, e permanecem detectáveis durante muitos anos, possivelmente por toda a vida do hospedeiro (67,69). Esses anticorpos apresentam também funções efetoras importantes, como a facilitação da fagocitose pela opsonização dos parasitos, a ativação do sistema complemento e a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo. As subclasses da IgG apresentam diferentes atividades efetoras e podem estar associadas com processos patológicos distintos (70). Embora haja poucos relatos sobre a pesquisa das diferentes subclasses de anticorpos IgG na infecção pelo *T. gondii*, as investigações realizadas em humanos mostram dados concordantes quanto ao predomínio da resposta de IgG₁ anti-*T. gondii* independentemente da população estudada (imunocompetentes, imunocomprometidos e gestantes) e da fase da infecção (aguda ou latente) (71-74). Tais pesquisas, no entanto, divergem em relação à presença das demais subclasses. Derouin et al. (71) e Huskinson et al. (72) demonstraram o grande predomínio de anticorpos IgG₁, com baixas concentrações de IgG₂ e IgG₃ e ocasional detecção de IgG₄. Contudo, Ee et al. (73) mostraram a IgG₁ como subclasse dominante, com baixa mas significativa presença de IgG₃ e IgG₄, enquanto que a IgG₂ não foi detectada. Em amostras de gestantes, Cañedo-Solares et al. (74) detectaram maior ocorrência de IgG₁, seguido por IgG₄ e IgG₂, e ausência de IgG₃. Os anticorpos IgA, produzidos também durante a infecção aguda, são capazes de promover a citotoxicidade celular mediada por anticorpos, por meio de ativação de neutrófilos que apresentam receptores para este anticorpo (70). Os anticorpos

IgA são encontrados principalmente nas secreções mucosas e embora suas funções efetoras sejam pouco estudadas na resposta imune contra o *T. gondii* em humanos, os estudos *in vitro* mostram uma redução de 50-75% na infecção de enterócitos por taquizoítos na presença de IgA secretória (50,75), indicando que esses anticorpos atuam como uma importante barreira da infecção pelo parasito. Os anticorpos IgE têm sido detectados na infecção pelo *T. gondii*, porém, seu papel na imunidade contra esse protozoário ainda não é claro (76,77). Não há, até o presente momento, relato da pesquisa de anticorpos IgD na infecção toxoplásmica.

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. gondii* pode ser feito por testes sorológicos, pesquisa de DNA por meio de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), demonstração histológica do parasito e/ou seus antígenos ou isolamento do parasito de amostras biológicas suspeitas pela inoculação em animais de laboratório ou em cultura de células (3). Em virtude de maior simplicidade técnica, tradicionalmente o diagnóstico da toxoplasmose tem se baseado na pesquisa de anticorpos específicos anti- *T. gondii* (78).

Em 1948, Sabin e Feldman (8) desenvolveram o primeiro teste sorológico para o diagnóstico da toxoplasmose (teste do corante), que se baseia na detecção de anticorpos específicos utilizando-se parasitos vivos como preparação antigênica. Embora não permita distinguir a classe de anticorpo, essa reação ainda hoje é utilizada como padrão-ouro em laboratórios de referência, em função da sua alta sensibilidade e especificidade (25,79). Em 1964, Camargo desenvolveu o teste de imunofluorescência indireta (IFI), com resultados comparáveis ao teste do corante, que permite efetuar a identificação das diferentes classes de anticorpos, empregando-se suspensões de parasitos íntegros fixados em lâminas de microscopia (80). A partir da década de 70, foram desenvolvidos testes imunoenzimáticos, utilizando-se preparações antigênicas do *Toxoplasma* fixadas em superfícies plásticas inertes, com sensibilidade e especificidade superiores às das reações de IFI (81,82).

O diagnóstico da infecção toxoplásmica adquirida é ainda baseado na detecção de anticorpos específicos, utilizando-se os seguintes critérios sorológicos: soroconversão, detecção de anticorpos IgM, detecção de aumento de títulos de anticorpos específicos (usualmente IgG) e determinação da avidéz dos anticorpos IgG. A soroconversão (o critério mais confiável) e a detecção do aumento da concentração de anticorpos específicos dificilmente são observadas (83,84). A detecção de anticorpos IgM tem sido muito utilizada

para o diagnóstico da infecção recente, uma vez que esses anticorpos são produzidos no início da infecção e na maioria dos pacientes tornam-se indetectáveis dentro de poucos meses (69). Entretanto, alguns fatores podem dificultar a interpretação dos resultados da pesquisa positiva de IgM, como a persistência desses anticorpos em algumas pessoas durante meses ou mesmo anos após o início da infecção (85,86), a ocorrência de reações falso-positivas (87,88) e a possibilidade de detecção da IgM em pacientes com reativação da infecção ou reinfecção (89). Em pacientes com IgM e IgG positiva, a determinação da avididade dos anticorpos IgG pode ser importante para distinguir entre infecção recente e de longa duração, especialmente em gestantes, quando o teste é realizado no primeiro trimestre de gestação (90). A detecção dos anticorpos IgA anti-*T. gondii* tem sido considerada por alguns autores como marcador de infecção recente (91,92). No entanto, alguns trabalhos mostram que esses anticorpos podem não ser detectados em alguns adultos com infecção aguda, ou quando são detectados podem persistir por um período de tempo muito variável, muitas vezes igual ou superior ao dos anticorpos da classe IgM, razão pela qual apresenta pouco valor no diagnóstico de infecção aguda em adultos (84,85,93). Em recém-nascidos, a detecção de IgM e IgA, geralmente, indica a ocorrência de infecção congênita, visto que essas classes de anticorpos não são capazes de atravessar a placenta; entretanto a sua ausência não descarta a possibilidade de transmissão do *T. gondii* para o feto. O diagnóstico de certeza é obtido pela comprovação da manutenção ou elevação dos títulos de anticorpos IgG na criança após o nascimento (3). Os anticorpos IgE são encontrados com menor frequência dos que os anticorpos IgM e IgA, apresentando valor diagnóstico mais limitado (49,94,95).

O diagnóstico definitivo da neurotoxoplasmose requer a demonstração do parasito em amostras cerebrais obtidas por biópsia, mas este método, além de não apresentar boa sensibilidade, está associado com significativa morbidade e mortalidade (96,97). Na prática clínica, o diagnóstico presuntivo da neurotoxoplasmose em pacientes com contagem de células T CD4+ <200 células/ μ l se baseia em resultados positivos nos testes sorológicos para o *T. gondii*, em sinais e sintomas clínicos sugestivos de disfunção do SNC e na presença de lesões sugestivas no cérebro, detectadas por tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) (98-100).

Diversos trabalhos têm relatado a utilização da técnica de PCR na confirmação diagnóstica da neurotoxoplasmose, pela detecção de DNA do *T. gondii* em amostras biológicas, como sangue e LCR. Entretanto, diferentes variações da técnica têm sido empregadas, como a amplificação de diferentes regiões do DNA do parasito e a extração do material nucléico com vários reagentes e procedimentos comerciais e não comerciais (101). Desta maneira, embora a PCR seja uma importante ferramenta para confirmação diagnóstica da neurotoxoplasmose, o fato de não haver um consenso ou padronização dos diferentes procedimentos e alvos existentes, têm gerado resultados discordantes entre os laboratórios.

O *T. gondii* é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar o cérebro por meio de células dendríticas e/ou macrófagos infectados (102). Os taquizoítos podem infectar diferentes tipos de células nervosas, como neurônios, astrócitos e células da micróglia no cérebro e células de Purkinje no cerebelo. A proliferação intracerebral do parasito ocorre facilmente em neurônios e astrócitos, enquanto as células da micróglia ativadas impedem a sua replicação de forma eficiente, limitando a sua proliferação no SNC. Essas células também induzem a produção de diversas citocinas que promovem ou suprimem a resposta inflamatória (102-104).

Os efeitos da infecção pelo *T. gondii* nas células do cérebro podem ser quase imediatos. Análises de expressão gênica utilizando *microarrays* de DNA em fibroblastos humanos infectados pelo *T. gondii* evidenciam que durante as duas primeiras horas de infecção, menos de 1% de todos os genes mostram aumento significativo na quantidade de material transcrito. Dos 63 genes conhecidos nesse grupo, 27 (43%) são responsáveis pela codificação de proteínas associadas com a resposta imune. Esses genes são também regulados por fatores solúveis dos parasitos extracelulares, indicando que a resposta precoce contra o *T. gondii* não requer invasão celular (105). Taquizoítos intracelulares podem também manipular os diversos sinais e mecanismos de transdução envolvidos com apoptose (106,107), funções efetoras antimicrobianas (108) e influenciar na maturação das células imunes (109). Aproximadamente 10 dias após a infecção, os taquizoítos se convertem em bradizoítos. Essas formas resistentes são capazes de escapar do sistema imune do hospedeiro, assim como da maioria dos agentes terapêuticos (103,105,110). Os

estudos de microscopia eletrônica de cérebro de camundongos cronicamente infectados mostraram que a maioria dos cistos do parasito está localizada em neurônios (103,111).

Durante a infecção latente, os bradizoítos se dividem lentamente dentro dos cistos, podendo manter-se em estado de latência durante toda a vida do hospedeiro. No entanto, estados de imunossupressão podem acarretar a reativação desses cistos, com a conversão de bradizoítos em taquizoítos, que pode resultar em neurotoxoplasmose, um grave problema para pacientes imunocomprometidos (112,113). Os danos causados por esta doença compreendem focos de necrose cerebral, particularmente no tálamo (114) e nódulos microgliais (115). A presença de abscessos é manifestação característica em pacientes com imunossupressão grave, especialmente naqueles com SIDA (49,115).

Outro aspecto que tem chamado atenção sobre o efeito da infecção pelo *T. gondii* no cérebro diz respeito a alterações comportamentais. Alguns pesquisadores têm mostrado que o *T. gondii* é um bom exemplo de parasito manipulador, com a sua transmissão facilitada pela sua habilidade de modificar o comportamento do hospedeiro. Os estudos realizados em roedores demonstraram que os animais não infectados apresentam aversão inata a odores felinos, enquanto que em animais infectados a percepção cognitiva do risco predatório pelos gatos é sutilmente e especificamente alterada, transformando a aversão em atração suicida (116,117). Estudos recentes evidenciam que o *T. gondii* altera as atividades neurais em áreas límbicas do cérebro associadas com a atração sexual, quando os roedores são expostos a odor de urina de gato, o que faz com que a resposta de medo seja inibida (118). As pesquisas realizadas em humanos sugerem que a infecção latente pelo *T. gondii* pode alterar também o comportamento do hospedeiro, influenciando as habilidades psicomotoras e a personalidade (119-121). Consistente com a possível redução na atividade psicomotora, os indivíduos com toxoplasmose latente têm 2,65 vezes mais risco de se envolver em acidentes de carro do que a população geral (122-124). Os estudos epidemiológicos, comportamentais e neuroquímicos têm sugerido também a existência de uma associação entre esquizofrenia e infecção pelo *T. gondii* (125).

Alguns pesquisadores consideram a esquizofrenia como sendo um distúrbio neurodesenvolvimental, em que o dano neurológico primário ocorre durante o desenvolvimento fetal (126,127), e embora a etiologia desse transtorno psiquiátrico seja ainda desconhecida, acredita-se que fatores genéticos e ambientais estejam envolvidos

(57,128-130). Entre os fatores ambientais suspeitos de envolvimento no aparecimento da esquizofrenia, está a exposição aos agentes patogênicos, principalmente a exposição precoce ainda no útero. Brown et al. (57) sugeriram que a exposição materna ao *T. gondii* aumenta o risco de esquizofrenia em seus descendentes.

Vários trabalhos têm mostrado que pacientes com esquizofrenia apresentam prevalência e/ou concentrações séricas de IgG anti-*T. gondii* significativamente maiores do que o grupo controle (122,131). Torrey e Yolken (132) verificaram que os indivíduos com esquizofrenia apresentaram maior exposição a gatos na infância em comparação ao grupo controle. Os pacientes com SIDA com neurotoxoplasmose geralmente desenvolvem sintomas psiquiátricos como delírios e alucinações, que podem ser confundidos com esquizofrenia (122). Outra evidência que associa a esquizofrenia à toxoplasmose é o fato de drogas antipsicóticas conhecidas por serem efetivas na esquizofrenia também apresentam ação inibitória contra o *T. gondii* (130,133). Entre as hipóteses que associam o *T. gondii* como possíveis agentes etiológicos envolvidos no aparecimento da esquizofrenia, estão à ação direta do parasito sobre o SNC e a ação do sistema imune frente à infecção, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias ou indução de óxido nítrico, que no cérebro pode levar a uma disfunção neural e comportamental, além do fato de estudos experimentais mostrarem que determinadas citocinas ou mesmo o *T. gondii* podem causar alterações no nível de certos neurotransmissores envolvidos nesse transtorno mental (134).

Outros transtornos mentais conhecidos como transtornos do humor são classificados de acordo com a natureza e a gravidade dos sintomas durante cada episódio e pelo curso da doença (135,136). Existe uma distinção fundamental entre transtorno depressivo recorrente (caracterizado por episódios de depressão) e transtorno afetivo bipolar (caracterizado por episódios maníacos, hipomaníacos ou mistos, alternados ou não com episódios depressivos) (136). A etiologia dos transtornos do humor está também associada com uma série de fatores biológicos, genéticos e psicossociais (135). Diferentemente da esquizofrenia, existem muito poucos estudos com dados sugestivos da associação entre toxoplasmose e transtornos do humor (137,138).

Apesar de inúmeros trabalhos publicados desde a década de 50 que associam a infecção pelo *T. gondii* aos transtornos mentais, especialmente esquizofrenia, ainda não existem estudos sobre essa associação na população brasileira.

2- OBJETIVOS

1. Avaliar as técnicas de nPCR e PCRc para a pesquisa de DNA do *T. gondii* em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose.
2. Pesquisar anticorpos IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ anti-*T. gondii* em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose, por meio de ELISA padronizada com uma preparação antigênica de cistos do parasito.
3. Avaliar a prevalência e a concentração de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro de pacientes com esquizofrenia e transtornos do humor.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Pacientes e amostras

Para a pesquisa de DNA do *T. gondii* foram testadas amostras de LCR de nove pacientes com neurotoxoplasmose (sete homens e duas mulheres, idades entre 20 e 48 anos) e cinco pacientes com outras desordens neurológicas (dois com neurocriptococose, dois com neurosífilis e um com neurocisticercose) soronegativos para o *T. gondii*. Dos nove pacientes com neurotoxoplasmose, oito eram soropositivos para o HIV e apresentavam pesquisa de IgG anti-*T. gondii* positiva no soro. O diagnóstico de neurotoxoplasmose nestes pacientes foi baseado na presença de sintomas neurológicos e/ou clínicos, lesões sugestivas da doença evidenciadas por exames de TC e/ou RM, aliados a melhora clínica após tratamento. O paciente soronegativo para HIV tinha diagnóstico de toxoplasmose aguda (IgM e IgG anti-*T. gondii* positivas no soro, com baixa avidéz da IgG) com envolvimento do SNC e melhora dos sintomas após tratamento antiparasitário. Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos pela pesquisa de seus registros clínicos.

As técnicas de nPCR e PCRc foram também testadas em amostras artificiais contendo diferentes concentrações de taquizoítos. A concentração de parasitos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e os padrões foram preparados efetuando-se diluições com solução salina tamponada com fosfatos 0,15 M, pH= 7,2 (SST)

Para a pesquisa das subclasses da IgG, foram analisadas amostras de LCR de 19 pacientes [15 homens e quatro mulheres, idades entre 19 e 58 anos (média 35,2 anos)] com diagnóstico de neurotoxoplasmose (16 com SIDA, um receptor de transplante renal, um com linfoma de Burkitt e um com toxoplasmose aguda com envolvimento cerebral). As amostras de LCR de todos os pacientes eram positivas para anticorpo IgG anti-*T. gondii* por ELISA, utilizando uma preparação antigênica de cistos do parasito. Nove pacientes apresentavam PCR positiva para o *T. gondii*. Vinte e cinco amostras de LCR de pacientes com outras desordens neurológicas [esclerose múltipla (n=11), neurocisticercose (n=5), neurosífilis (n=3), neurocriptococose (n=3) e meningite (n=3)] foram utilizadas como controle.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em pacientes com transtornos mentais foram analisadas amostras de soro de 41 pacientes com esquizofrenia (28 homens e 13 mulheres, idades entre 15 e 69 anos, média-32,7 anos), 38 amostras de soro de pacientes com transtornos do humor (15 homens e 23 mulheres, idades entre 15 e 76 anos, média

44,8 anos) [incluindo transtorno bipolar (n=24) e transtorno depressivo (n=14)] e 95 amostras de soro de voluntários sadios (estudantes universitários e profissionais atuantes de diferentes níveis de escolaridade da cidade de Campinas, SP, Brasil, sendo 47 homens e 48 mulheres, idades entre 15 e 77 anos, média 38,2 anos). Os pacientes com transtornos mentais eram acompanhados regularmente no ambulatório de Psiquiatria do Hospital de Clínicas da UNICAMP e preenchem os critérios diagnósticos definidos pelo DSM-IV. Todos os participantes da pesquisa receberam um questionário em que responderam sim ou não às seguintes perguntas: convívio com gatos, hábito de comer carne crua ou mal cozida e contato com o solo.

Todos os pacientes incluídos no presente trabalho foram atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil. Foram somente utilizadas amostras de LCR com volume suficiente para avaliação das técnicas nPCR e PCRC e para a detecção da IgG e suas subclasses, após a realização dos exames laboratoriais solicitados. A participação dos pacientes e dos indivíduos do grupo controle foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

3.2- Extração de DNA

As amostras de LCR dos pacientes e as amostras artificiais foram centrifugadas a 18.000 x g por 30 min, a 4 °C, sendo o precipitado ressuscitado em 50 µl de água deionizada estéril e submetido a aquecimento a 94 °C, por 15 min, sob agitação contínua em agitador térmico Thermomixer® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), para efetuar a lise total das células. Após esse procedimento, as amostras foram analisadas pelas técnicas de PCR. Para a preparação das amostras artificiais e controles positivos foram utilizados taquizoítos da cepa RH, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior (Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo). A concentração de DNA extraído foi determinada a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA).

3.3- Técnicas de PCR

A nPCR foi realizada utilizando dois pares de iniciadores para o gene B1 do *T. gondii* (139). Os iniciadores externos 5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3' (posição

694-714) e 5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3' (posição 887-868) foram empregados para amplificação de um fragmento de 194-pb e os iniciadores internos 5'-TGCA-TAGGTTGCAGTCACTG-3' (posição 757-776) e 5'-GGCGACCAATCTGCGAATAC-ACC-3' (posição 853-831), para amplificação de um fragmento de 97-pb. A primeira amplificação foi realizada em 50 µl de solução de reação [10 mM de Tris-HCl, 1,5 µM de MgCl₂, 100 µM de dNTP, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Inc., Vilnius, Lituânia)], contendo 0,1 µM de cada iniciador externo (Prodimol, Belo Horizonte, Brasil) e 10 µl do DNA. As condições da reação foram: 5 min a 93 °C seguidos por 35 ciclos de 1 min a 93 °C, 1 min a 55 °C e 2 min a 72 °C e uma extensão final de 7 min a 72 °C. A segunda amplificação foi realizada com volume final de 25 µl da solução de reação, usando iniciadores internos e 0,5 µl do produto da primeira amplificação como alvo. As condições da reação foram: 5 min a 94 °C seguidos por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 s a 58 °C e 1:30 min a 72 °C e uma extensão final de 7 min a 72 °C. Ambas as reações foram realizadas em termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, EUA).

A PCRc foi realizada utilizando um par de iniciadores para outra sequência do gene B1 do *T. gondii*, conhecidos como B22: 5'-AACGGGCGAGTAGCAC-CTGAGGAGA-3' (posição 1793-1817) e B23: 5'- TGGGTCTACGTCGATGGCA-TGACAAC-3' (posição 1907-1881) que amplifica um fragmento de 115-pb (140). A amplificação foi realizada em um volume final de 50 µl da solução de reação contendo 0,4 µM de cada iniciador (Prodimol, Belo Horizonte, Brasil), 10 mM de Tris-HCl, 1,5 µM de MgCl₂, 100 µM de dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Inc., Vilnius, Lituânia) e 5 µl de DNA. As condições da reação foram: 5 min a 95 °C seguidos por 45 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 58 °C, 1 min a 72 °C e uma extensão final de 7 min a 72 °C em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Em cada reação foram incluídos dois controles negativos (água estéril e amostra de LCR negativa para o *T. gondii*) e um controle positivo para o DNA do *T. gondii*. O produto final de cada reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% contendo 0,01% de brometo etídio. Os fragmentos foram visualizados em transiluminador UV (Kodak, Rochester, EUA).

3.4- Obtenção da preparação antigênica de *T. gondii* para reações de ELISA

Os cistos do *T. gondii* foram isolados de cérebros de camundongos previamente inoculados com cistos da cepa P do parasito, por centrifugação em solução de Dextran a 20% (141). Após lavagem com SST, a suspensão contendo cistos foi sonicada (Branson Sonifier, Ultrasonics, Danbury, EUA), em banho de gelo, utilizando potência 2, pulso de 20%, por 3 min. Os inibidores de protease, fluoreto de metil-fenil-sulfonil e leupeptina, foram adicionados ao material sonicado de modo a se obter concentrações finais de 0,0025 mM e 5 mM, respectivamente. Após agitação por 2 horas em banho de gelo e centrifugação a 10.000x g por 30 min, a 4 °C, o sobrenadante foi separado, aliqotado e estocado a -20 °C até o momento do uso. A concentração de proteína da preparação antigênica foi determinada pela técnica de Bradford (142), utilizando *kit* comercial (Ensaio de Proteínas de Bradford, BioAgency, São Paulo, Brasil).

3.5- ELISA para detecção de anticorpos das subclasses da IgG

As placas de ELISA de 96 cavidades de fundo em U (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) foram sensibilizadas com a preparação antigênica diluída a 1 µg de proteína/ml em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH=9,5, por incubação durante 1 hora à temperatura ambiente (TA) e 16 horas a 4 °C. Após três lavagens das cavidades das placas com SST contendo 0,1% de Tween 20 (SST-T), 100 µl de SST-T contendo 0,1% de albumina sérica bovina (SST-T-ASB) foram adicionados às cavidades e as placas foram incubadas por 30 min à TA. Após lavagem das placas como já descrito, 100 µl de cada amostra de LCR diluída a 1:5 com SST-T foram adicionados em duplicata às cavidades e as placas foram incubadas por 1 hora à TA. Após lavagens com SST-T como já descrito, 100 µl dos anticorpos monoclonais anti-IgG₁, anti-IgG₂, anti-IgG₃ ou anti-IgG₄ (Sigma, St. Louis, EUA), diluídos a 1:750 com SST-T, foram adicionados às cavidades e as placas incubadas por 1 hora à TA. Após lavagem com SST-T como já descrito, 100 µl do conjugado (anticorpos IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcados com peroxidase (Sigma, St. Louis, EUA), diluído a 1:1000 com SST-T, foram adicionados às cavidades e as placas incubadas por 1 hora à TA. Após a incubação, as cavidades foram lavadas como já descrito e nestas foram adicionados 100 µl do sistema substrato constituído de 0,42 mM de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e 1,42 mM de H₂O₂ diluídos em tampão acetato de

sódio/ácido acético glacial 0,1 M, pH 5,5. Após incubação, por 5 min, à TA, no escuro, as reações foram interrompidas pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 2N. Em todas as placas de reação foram incluídos controles positivo e negativo. As absorbâncias das reações foram lidas a 450 nm em leitora de ELISA Multiskan MS (Labsystems, Helsinki, Finlândia) e as médias das absorbâncias das reações foram determinadas.

3.6- Pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro de pacientes com transtornos mentais e voluntários sadios

A pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* nas amostras de soro foi realizada por meio do sistema automatizado VIDAS[®] (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), seguindo as especificações do fabricante. Nesta metodologia, os resultados da pesquisa de IgM são expressos em forma de índice, considerando-se positivos os valores $\geq 0,65$. Os resultados da pesquisa de IgG são expressos em unidades internacionais (UI)/ml, sendo os valores ≥ 8 UI/ml considerados positivos. Nas amostras IgM positiva, foi realizado o teste de avididade da IgG, utilizando-se o sistema automatizado VIDAS[®] (em que índice de avididade $\geq 0,3$ é indicação forte de infecção adquirida há mais de quatro meses). A pesquisa de anticorpos IgA foi realizada por meio de *kits* comerciais ETI-TOXOK-A Reverse PLUS (DiaSorin, Sallugia, Itália), de acordo com as especificações do fabricante. Neste teste, padrões séricos com concentrações de anticorpos variando de 0 a 160 unidades arbitrárias (UA)/ml são incluídos em cada ensaio. Os valores de IgA anti-*T. gondii* >20 UA/ml foram considerados positivos.

3.7- Análise dos dados

Na pesquisa das subclasses da IgG, os valores de corte para as reações de ELISA foram determinados pela curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*) (143). A comparação entre as sensibilidades e as médias aritméticas das absorbâncias encontradas nos ELISAs para cada subclasse de anticorpos foi feita, respectivamente, pelos testes de Cochran (144,145) e ANOVA com transformação por postos (146), sendo valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

Nos pacientes com esquizofrenia, transtornos do humor e voluntários sadios, a comparação da prevalência dos anticorpos IgG, IgM e IgA e a relação nesses três grupos com as três questões formuladas (convívio com gato, ingestão de carne crua ou mal passada e contato com o solo) foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado (145). A razão de chances

[*Odds Ratio* (OR)] com intervalo de confiança de 95% foi usada para estimar a intensidade de associação entre as três questões formuladas nos três grupos estudados (145). Para a comparação das médias aritméticas das concentrações de IgG e IgA encontradas em cada grupo foi utilizado o teste ANOVA com transformação por postos, seguido pelo teste de Tukey para localização das diferenças (146).

As análises estatísticas foram feitas pelo programa SAS (Sistema de Análise Estatística) para Windows versão 9.2 (SAS Inc., Cary, EUA).

4- RESULTADOS

4.1- Pesquisa de DNA do *T. gondii* por nPCR e PCRc

Os resultados da pesquisa de DNA do *T. gondii* por nPCR e PCRc nas amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose são apresentados na Tabela 1. Como pode ser observado, a nPCR foi positiva nas amostras de todos os nove pacientes (100%), enquanto a PCRc foi positiva somente em amostras de cinco pacientes (55,5%).

Tabela 1. Dados clínicos, resultados laboratoriais e de neuroimagem dos pacientes com neurotoxoplasmose.

Paciente	Idade/ sexo	Presença de lesões cerebrais por TC ou RM	Terapia (dias) antes da coleta de LCR	Nº de células CD4+/ μ l	nPCR	PCRc
1	41/M	Sim	AT	50	Positivo	Positivo
2	34/F	Sim	AT	78	Positivo	Positivo
3	25/M	Sim	AT	249	Positivo	Negativo
4	20/M	Sim	AT	169	Positivo	Positivo
5	42/M	Sim	3	ND	Positivo	Negativo
6	39/M	Sim	18	ND	Positivo	Negativo
7	28/F	Sim	1	28	Positivo	Positivo
8	48/M	Sim	2	10	Positivo	Positivo
9*	47/M	ND	AT	ND	Positivo	Negativo

*paciente HIV negativo; ND = não determinado; AT = ausência de terapia; nPCR = nested-PCR; PCRc = PCR convencional.

A nPCR e a PCRc foram negativas nas cinco amostras de LCR de pacientes com outras desordens neurológicas (dois com neurocriptococose, dois com neurosífilis e um neurocisticercose).

Os resultados da nPCR e PCRc em amostras artificiais contendo diferentes concentrações de taquizoítos mostraram que a nPCR foi capaz de detectar concentrações de parasitos dez vezes menores do que a PCRc.

4.2- Pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* das subclasses da IgG em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose

As absorvâncias obtidas nas reações de ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* das subclasses da IgG nas amostras de LCR de 19 pacientes com neurotoxoplasmose e de 25 pacientes com outras desordens neurológicas são apresentados na Figura 1.

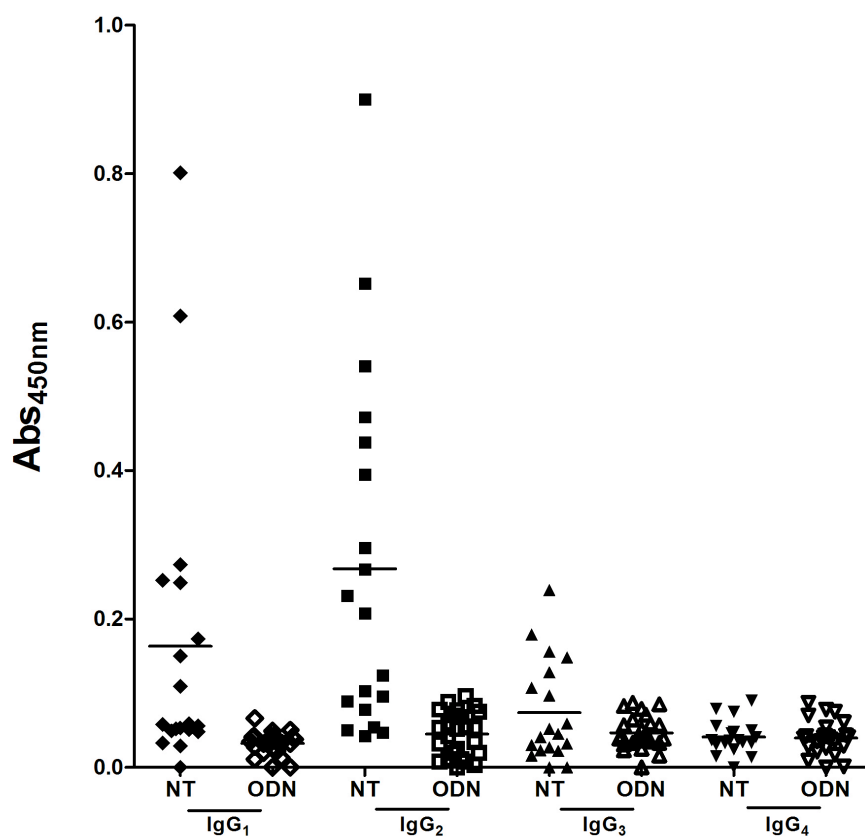


Figura 1. Resultado da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose (NT) e com outras desordens neurológicas (ODN). Abs_{450nm} = Absorvância obtida a 450nm. (—) = média aritmética. *Cut-off*: IgG₁ = 0,045; IgG₂ = 0,088; IgG₃ = 0,092; IgG₄ = 0,044.

Os resultados das sensibilidades das reações ELISA para a detecção das quatro subclasses da IgG, bem como as médias aritméticas das suas concentrações, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Pesquisa das subclasses da IgG anti-*T. gondii* por ELISA em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose.

Subclasses de IgG	Sensibilidade (%)	\bar{x} Abs _{450nm} (min. – max.)
IgG ₁	16/19 (84,2)	0,163 (0–0,80)
IgG ₂	14/19 (73,7)	0,264 (0,04–0,90)
IgG ₃	7/19 (36,8)	0,074 (0-0,24)
IgG ₄	7/19 (36,8)	0,041 (0-0,09)

\bar{x} = média aritmética; Abs = absorvância; min = mínima; máx = máxima.

A pesquisa de anticorpos IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ anti-*T. gondii* foi positiva, respectivamente, em 16 (84,2%), 14 (73,7%), 7 (36,8%) e 7 (36,8%) pacientes. Não foram encontradas diferenças significativas entre as sensibilidades e as médias aritméticas das absorvâncias das reações ELISA IgG₁ e ELISA IgG₂, enquanto que as sensibilidades e as médias aritméticas das absorvâncias dessas duas reações foram significativamente maiores do que as encontradas nas reações ELISA IgG₃ e ELISA IgG₄ ($p = 0,0042$ e $p < 0,0001$, respectivamente). As reações ELISA IgG₃ e ELISA IgG₄ apresentaram a mesma sensibilidade, entretanto a média aritmética da absorvância da reação ELISA IgG₃ foi significativamente maior do que a da reação ELISA IgG₄ ($p < 0,0001$).

4.3- Pesquisa de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras de soro de pacientes com transtornos mentais e de voluntários sadios

As Tabelas 3 e 4 apresentam, respectivamente, os resultados da prevalência dos anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* e as médias aritméticas das concentrações de IgG e IgA nas amostras de soro de pacientes com esquizofrenia, pacientes com transtornos do humor e voluntários sadios. A pesquisa de IgG foi positiva em 18/41 (43,9%) dos pacientes com esquizofrenia, 20/38 (52,6%) dos pacientes com transtornos do humor e em 27/95 (28,4%) dos voluntários sadios. A frequência de positividade da IgG e a média aritmética das concentrações desse anticorpo nos pacientes com transtornos do humor foram significativamente maiores do que as encontradas em voluntários sadios ($p=0,0204$ e $p=0,0059$, respectivamente), contudo não foram observadas diferenças significativas com relação a esses dois parâmetros entre pacientes com esquizofrenia e voluntários sadios, bem como entre os pacientes com esquizofrenia e transtornos do humor. A pesquisa de IgA foi positiva em um paciente com transtorno de humor (2,6%) que também apresentou IgM

positiva e em um voluntário sadio (1,05%) com IgM negativa. A pesquisa de IgM foi positiva em dois (5,2%) pacientes com transtornos do humor (ambos com transtorno depressivo). Nas amostras desses dois indivíduos, a avidéz da IgG foi $> 0,3$, indicando infecção adquirida há mais de quatro meses.

Tabela 3. Resultado da pesquisa de anticorpos IgG, IgM e IgA em pacientes com esquizofrenia, transtornos do humor e voluntários sadios.

Anticorpos	Pacientes com esquizofrenia (n=41)	Pacientes com transtornos do humor (n=38)	Voluntários sadios (n=95)
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
IgG	18 (43,9)	20 (52,6) ¹	27 (28,4)
IgM	0	2 (5,2)	0
IgA	0	1 (2,6)	1 (1,05)

UI/ml = unidades internacionais por ml; UA/ml = unidades arbitrárias por ml. Valores significativos para a pesquisa de anticorpos: IgG ≥ 8 UI/ml; IgM $\geq 0,65$; IgA ≥ 20 UA/ml.
(¹)p = 0,0204.

Tabela 4. Média da concentração dos anticorpos IgG e IgA em pacientes com esquizofrenia, transtornos do humor e voluntários sadios.

Anticorpos	Pacientes com esquizofrenia (n=41)	Pacientes com transtornos do humor (n=38)	Voluntários sadios (n=95)
	Média (dp)	Média (dp)	Média (dp)
IgG	69,0 UI/ml (119,7)	115,5 UI/ml (228) ²	35,3 UI/ml (86,3)
IgA	2,6 UA/ml (3,7)	4,1 UA/ml (9,0)	1,5 UA/ml (2,8)

Valores significativos para a pesquisa de anticorpos: IgG ≥ 8 UI/ml e IgA ≥ 20 UA/ml; dp = desvio padrão; (²)p = 0,0059.

A frequência do convívio com gatos encontrada nos pacientes com transtornos do humor foi significativamente maior do que aquela em voluntários sadios (p=0,0483), contudo o convívio com gato não representou um fator de risco para essa doença (OR=2,1633; IC95%=0,9981-4,6888). Não houve diferenças significativas com relação ao consumo de carne crua ou mal cozida e o contato com o solo nos pacientes com esquizofrenia, pacientes com transtorno do humor e voluntários sadios (Tabelas 4 e 5).

Tabela 5. Associação entre os fatores de risco para a toxoplasmose e transtornos do humor

	Pacientes com transtornos do humor (%)	Voluntários sadios (%)	Valor de p [†]	OR (IC95%)
A	24 (63,16)	42 (44,21)	0,0483	2,1633 (0,9981-4,6888)
B	14 (36,84)	38 (40)	0,7360	0,8750 (0,4025 1,9021)
C	19 (50)	40 (42,11)	0,4077	1,3750 (0,6462-2,9259)

A = convívio com gato; B = hábito de ingerir carne crua ou mal cozida; C = contato com solo; OR = odds ratio (razão de chances); IC = intervalo de confiança; p[†] = teste Qui-quadrado.

Tabela 6. Associação entre os fatores de risco para a toxoplasmose e esquizofrenia

	Pacientes com esquizofrenia (%)	Voluntários sadios (%)	Valor de p [†]	OR (IC95%)
A	19 (46,34)	42 (44,21)	0,8186	1,0898 (0,5224-2,2736)
B	10 (24,39)	38 (40)	0,0808	0,4839 (0,2126-1,1014)
C	12 (29,27)	40 (42,11)	0,1575	0,5690 (0,2591-1,2492)

A = convívio com gato; B = hábito de ingerir carne crua ou mal cozida; C = contato com solo; OR = odds ratio (razão de chances); IC = intervalo de confiança; p[†] = teste Qui-quadrado.

5- DISCUSSÃO

Em pacientes infectados pelo HIV, os baixos níveis de células CD4+ (<200 células/ μ l) possibilitam a reativação da toxoplasmose latente, com proliferação do parasito, podendo resultar em neurotoxoplasmose, com risco de morte se a infecção não for diagnosticada e tratada rapidamente (49,62,99). A conduta para pacientes HIV+ com manifestação de sintomas neurológicos e lesões cerebrais não é fácil, em virtude da gama de etiologias potenciais (147,148). O tratamento empírico da neurotoxoplasmose baseado no diagnóstico presuntivo tem algumas desvantagens, como exposição do paciente ao efeito colateral desnecessário (114,148,149), existindo o risco de falha no diagnóstico pelo atraso na busca por diagnóstico e/ou tratamentos adequados (148,150). Por estas razões, muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver e avaliar métodos diagnósticos rápidos e confiáveis para a confirmação desta infecção.

Nos últimos anos, a técnica de PCR tem permitido a detecção do DNA do *T. gondii* em diferentes tipos de amostras biológicas. Entretanto, a diversidade de procedimentos e a falta de estudos comparativos têm dificultado a interpretação dos resultados obtidos.

A eficiência da técnica de PCR para o diagnóstico da neurotoxoplasmose pode estar relacionada com vários fatores, como a condição imunológica do paciente no momento da coleta da amostra, o uso da terapia antiparasitária, a escolha do gene alvo e dos *primers*, além dos diferentes procedimentos de extração de DNA e métodos de amplificação. Os procedimentos de extração de DNA apresentam crucial importância para o desempenho da técnica de PCR e diferentes metodologias *in house* e comerciais têm sido avaliadas na análise de diferentes tipos de amostras biológicas. Alguns autores recomendam preferencialmente o uso de *kits* de reagentes de extração comerciais, cuja análise é executada em menor tempo de manipulação, diminuindo as chances de contaminação (151). Porém, a utilização de metodologias simples como aquecimento ou lise seguida de centrifugação são sugeridos para análise de amostras que apresentam baixa quantidade de células, como o LCR e líquido amniótico (152,153). No presente estudo, utilizando o método de extração de DNA por aquecimento, foi demonstrado que a nPCR apresentou melhores resultados do que a PCRc, tanto nas amostras de pacientes com neurotoxoplasmose como nas amostras artificiais contendo diferentes concentrações de parasitos. Embora os estudos anteriores indiquem que o uso da terapia antiparasitária cause

diminuição da sensibilidade diagnóstica da PCR, especialmente se a amostra for coletada após a primeira semana de tratamento (154,155), no presente estudo a nPCR foi positiva nas amostras de quatro pacientes na vigência de terapia antiparasitária (com amostras de LCR coletadas 1, 2, 3 e 18 dias após o início do tratamento), enquanto a PCRc foi positiva em somente dois desses pacientes (com amostras de LCR coletadas 1 e 2 dias após o início do tratamento). Em 1996, Cingolane et al. (154), usando nPCR com os mesmos iniciadores utilizados no presente estudo, relataram a detecção de DNA do *T. gondii* em uma amostra de LCR de um paciente em tratamento há 43 dias.

A toxoplasmose com envolvimento do SNC não é um evento usual em pacientes HIV negativos. Neste estudo, a nPCR foi positiva no LCR de um paciente HIV negativo, com infecção toxoplásmica aguda apresentando sintomatologia compatível com neurotoxoplasmose, confirmada pela melhora clínica após tratamento antiparasitário.

Os resultados obtidos até o presente momento indicam que a nPCR utilizada no presente estudo pode ser uma ferramenta potencialmente útil para a confirmação diagnóstica da neurotoxoplasmose.

Existem poucos estudos sobre a detecção das diferentes subclasses de anticorpos IgG em pacientes com toxoplasmose. Em todos os trabalhos consultados, a pesquisa de anticorpos foi realizada em amostras de soro utilizando preparações antigênicas de taquizoítos. Derouin et al. (71) empregaram ELISA padronizada com preparação antigênica de taquizoítos e analisaram amostras sequenciais de soros de pacientes imunocompetentes e com comprometimento do sistema imune (receptores de transplantes de rim ou medula óssea e pacientes infectados com o HIV), as quais foram coletadas antes e após a reativação da infecção toxoplásmica. Esses autores evidenciaram a positividade de anticorpos IgG₁, IgG₂ e IgG₃ nas amostras de todos os pacientes analisados, com concentrações elevadas de anticorpos IgG₁ e baixas concentrações de anticorpos IgG₂ e IgG₃, enquanto os anticorpos IgG₄ não foram usualmente detectados. Ee et al. (73) utilizaram ELISA padronizada com preparação antigênica de taquizoítos para testar soros de pacientes positivos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* e observaram que a IgG₁ foi a subclasse dominante na resposta imune para o *T. gondii*. Os anticorpos IgG₃ e IgG₄ foram detectados em concentrações baixas, porém significantes, mas a produção de anticorpos IgG₂ não foi evidenciada. Huskinson et al. (72) testaram os soros de pacientes obtidos nas

fases aguda e crônica da infecção por meio de imunoblot padronizado com duas preparações antigênicas de taquizoítos (reduzidas e não reduzidas) e verificaram que a resposta humoral para o *T. gondii* foi predominantemente de anticorpos IgG₁, que reconheceram um grande número de antígenos de ambas as preparações (os antígenos com PM entre 22.000 a 35.000 foram mais intensamente reconhecidos). Em contraste, poucos antígenos das duas preparações antigênicas foram reconhecidos pelos anticorpos IgG₂ e IgG₃, e os anticorpos IgG₄ raramente reagiram com os antígenos em ambas as preparações. Os anticorpos IgG₂ reagiram com antígenos de variados pesos moleculares, das preparações não reduzidas, cujas bandas foram mais intensamente coradas. Os anticorpos IgG₃ reconheceram principalmente antígenos com PM <35.000. Houve correlação dos resultados obtidos nas reações imunoblot e ELISA, padronizada com um extrato bruto salino de taquizoítos, o que indica a predominância de anticorpos IgG₁ na resposta para o *T. gondii*. Cañedo-Solares et al. (74) pesquisaram a presença de anticorpos das subclasses da IgG nos soros de mães expostas ao *T. gondii* e de seus respectivos recém-nascidos, por meio de ELISA empregando preparação antigênica de taquizoítos. Esses investigadores mostraram que os anticorpos IgG₁ foram os mais frequentemente detectados, tanto nos soros das mães como das crianças (cerca de 50% dos casos).

No presente estudo, os anticorpos IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ anti-*T. gondii* foram detectados, respectivamente, em 84,2%, 73,7%, 36,8% e 36,8% das amostras de LCR dos pacientes com neurotoxoplasmose, por meio de ELISA padronizada com preparação antigênica de cistos do parasito. Cabe salientar que a detecção de anticorpos no LCR pode refletir a síntese local de anticorpos específicos pelas células imunocompetentes que adentraram no SNC e/ou a difusão de proteínas do sangue após disfunção da barreira hematoencefálica (156).

Embora os estudos sobre a produção de anticorpos para os diferentes estágios do *T. gondii* na espécie humana mostrem que a resposta imunológica é significativamente maior para os antígenos de taquizoítos do que de cistos (157,158), considerando que o rompimento dos cistos no cérebro, com a conseqüente liberação de antígenos, possa ser um evento capaz de desencadear a reativação da doença no SNC, no presente estudo foi empregada uma preparação antigênica de cistos do parasito. Dos 17 pacientes com SIDA incluídos no estudo, 12 faziam uso regular de terapia antirretroviral e sete estavam em

seguimento terapêutico para toxoplasmose no momento da coleta do LCR. Dois pacientes em uso irregular de terapia antirretroviral recebiam também tratamento para toxoplasmose. Entre os três pacientes soronegativos para o HIV, apenas o receptor de transplante renal fazia uso de terapia para toxoplasmose. Machala et al. (159) verificaram que o tratamento antirretroviral e/ou os regimes terapêuticos para toxoplasmose não resultaram em mudanças significativas da concentração de anticorpos IgG anti-*T.gondii*.

Vários trabalhos têm demonstrado que a infecção pelo *T. gondii* gera uma resposta parasito-específica polarizada do tipo Th1, caracterizada por acentuada produção de INF- γ e de fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelas células mononucleares do sangue periférico, após estimulação com antígenos do parasito e a produção de altos níveis de anticorpos específicos IgG₁ (160-162). Os resultados do presente estudo confirmaram a predominância de anticorpos IgG₁ na resposta imunológica para o *T. gondii*. A IgG₁ corresponde aproximadamente a 67% da concentração da IgG sérica e vários estudos mostram que esta subclasse de anticorpos é a primeira a ser produzida após o estímulo antigênico (66,70). Os anticorpos IgG₁ são muito efetivos na proteção contra agentes infecciosos, com alta capacidade de ativar o sistema complemento e grande afinidade pelos receptores Fc γ RI, II e III que favorecem a fagocitose (70).

Diferentemente dos dados existentes na literatura, os anticorpos IgG₂ foram encontrados com alta frequência e em concentração similar aos anticorpos IgG₁ nas amostras de LCR dos pacientes analisadas neste estudo. A IgG₂ é a segunda subclasse mais abundante no soro, correspondendo aproximadamente a 22% da concentração da IgG (70). Essa subclasse da IgG desempenha um papel importante na resposta imune, particularmente em infecções com bactérias encapsuladas (163). A IgG₂ tem baixa capacidade de ativar o sistema complemento. A fagocitose, por meio da ligação da porção Fc da IgG₂ ao seu receptor (Fc γ R IIa) existente na membrana celular das células polimorfonucleares, é o principal papel biológico dessa subclasse de imunoglobulina (164).

A resposta das subclasses de IgG pode variar consideravelmente de acordo com o estímulo imunogênico. A IgG₁ e a IgG₃ são produzidas principalmente em resposta a antígenos protéicos (165), ao passo que a IgG₂ é produzida primariamente contra antígenos polissacarídeos (163,166). A IgG₄ tem sido observada em processos alérgicos e no curso de algumas infecções helmínticas (167,168).

Diferenças com relação aos resultados encontrados na literatura podem estar relacionadas a vários fatores, salientando-se a heterogeneidade dos pacientes analisados no estudo, o estado imune dos pacientes na época de coleta das amostras de sangue e/ou LCR, as propriedades intrínsecas das técnicas, a preparação antigênica e o procedimento de cálculo do *cut-off* das reações. Diferentemente dos taquizoítos, os bradizoítos possuem grandes reservas de polissacarídeos, armazenadas nos numerosos grânulos de amilopectina presentes em seu citoplasma (12,169). A presença desses polissacarídeos na preparação antigênica utilizada na reação ELISA pode ter sido responsável pela alta frequência de IgG₂ detectada.

A determinação do perfil da resposta de anticorpos para o *T. gondii* em pacientes com neurotoxoplasmose poderia contribuir para melhor entendimento da fisiopatogênica dessa doença. A alta frequência de detecção de anticorpos IgG₂ em LCR de pacientes com neurotoxoplasmose encontrada neste trabalho merece ser investigada em estudos adicionais.

A idéia de que os agentes patogênicos poderiam estar envolvidos com o aparecimento de doenças psiquiátricas surgiu em 1896, quando a revista *Scientific American* publicou um editorial *apud* Torrey e Yolken (170) intitulado *Is Insanity due to a microbe?* no qual sugere-se que alguns tipos de insanidade poderiam ser causados por agentes infecciosos.

Há muitos anos, vários autores têm investigado a associação entre determinados agentes patogênicos e a ocorrência de esquizofrenia, e entre os agentes patogênicos suspeitos de envolvimento com esta doença inclui-se o *T. gondii*. Desde 1953, pesquisadores de diversos países têm realizado estudos que indicam uma relação entre a esquizofrenia e a infecção pelo *T. gondii* (170). O *T. gondii* tem sido considerado como um dos possíveis fatores causais da esquizofrenia por várias razões: (a) muitos estudos têm relatado que indivíduos com esquizofrenia têm prevalência e/ou concentrações de anticorpos IgG anti-*T. gondii* significativamente maiores do que os indivíduos controles (130,131,171,172); (b) a exposição ao *T. gondii* durante a gestação ou logo após o nascimento tem sido associada a um maior risco de desenvolvimento de esquizofrenia (57,173); (c) alguns estudos têm mostrado que indivíduos com esquizofrenia tiveram maior exposição a gatos na infância do que os controles (128,130,132); (d) alguns indivíduos com

neurotoxoplasmose desenvolvem sintomas psicóticos similares àqueles com esquizofrenia (130,174); (e) similaridade em termos epidemiológicos entre esquizofrenia e toxoplasmose, como os aspectos familiares e genéticos, a idade do início das duas doenças, a idade de manifestação das doenças em homens e mulheres, o *status* sócio-econômico das famílias e o número de habitantes do lar, o número de natimortos e a associação geográfica entre a prevalência para toxoplasmose e esquizofrenia (130); (f) a inibição do *T. gondii* por algumas drogas antipsicóticas efetivas em esquizofrenia (130-133); (g) os níveis elevados de dopamina em indivíduos com esquizofrenia e em animais experimentalmente infectados pelo *T. gondii* (130,175).

Existem muito poucos trabalhos na literatura sobre a associação do *T. gondii* com os transtornos do humor. Em 2004, Kar e Misra (137) sugeriram uma provável associação entre a toxoplasmose e a depressão ao relatar um caso em que o paciente soropositivo para toxoplasmose apresentou resposta aos antidepressivos apenas após a introdução de terapia antiparasitária. Em 2009, Arling et al. (138) evidenciaram que os títulos de anticorpos IgG anti-*T.gondii* foram significativamente maiores em pacientes com transtornos do humor com histórico de tentativa de suicídio, quando comparados aos títulos de pacientes que apresentavam apenas transtornos do humor, embora a soroprevalência não tenha sido diferente entre os dois grupos.

No presente estudo a taxa de soropositividade da IgG e a média aritmética das concentrações desse anticorpo nos pacientes com transtornos do humor foram significativamente maiores do que as encontradas em voluntários saudáveis, contudo não houve diferenças significativas com relação a esses dois parâmetros entre os pacientes com esquizofrenia e voluntários saudáveis, bem como entre os pacientes com esquizofrenia e transtornos do humor. Os anticorpos IgM têm sido detectados em um número reduzido de pacientes com esquizofrenia (122,176-179). No presente estudo, a pesquisa de IgM foi positiva em somente dois pacientes com transtornos do humor. Os dois pacientes apresentaram avidade da IgG >0,3, indicando infecção adquirida há mais de quatro meses. Existem poucos trabalhos sobre a detecção de anticorpos IgA anti- *T. gondii* em doenças psiquiátricas. Yolken et al. (180), embora tenham avaliado a detecção de IgA em um número pequeno número de indivíduos, mostraram que pacientes com esquizofrenia tinham níveis significativamente maiores desse anticorpo do que o grupo controle. No presente

trabalho, a IgA foi detectada somente em um paciente com transtorno do humor e em um voluntário sadio.

Entre os fatores de risco conhecidos para a toxoplasmose, o convívio com gato tem sido associado com a esquizofrenia (128,132,180). Torrey e Yolken (132) verificaram que em indivíduos com doenças mentais sérias, 51% haviam convivido com gatos na infância contra 38% dos controles. Torrey et al. (128) avaliaram os fatores de risco ambientais para o desenvolvimento de esquizofrenia, transtorno esquizoafetivo e transtorno bipolar, por meio de pesquisa telefônica, e verificaram que a posse de gatos entre o nascimento até idade de 13 anos foi significativamente maior nos pacientes do que nos controles. Yuksel et al. (180) mostraram que a prevalência de contato com gato entre os indivíduos com esquizofrenia (59%) foi significativamente maior do que as encontradas em pacientes com diferentes transtornos psiquiátricos (6%) e controles sadios (9%). Os resultados do presente estudo indicaram associação somente entre o convívio com gato e transtornos do humor, entretanto essa associação não representou um fator de risco para essa doença.

Diferenças com relação aos resultados encontrados na literatura podem estar relacionadas a vários fatores, como o tamanho amostral, a heterogeneidade dos pacientes e os indivíduos controles participantes do estudo, as propriedades intrínsecas das técnicas empregadas para a pesquisa de anticorpos e a prevalência da infecção toxoplásmica na população. Estima-se que aproximadamente 1/3 da população mundial tenha sido exposta ao *T. gondii*, com grande variação de valores de soroprevalência entre diferentes países, entre diferentes regiões dentro de um país e mesmo entre diferentes grupos étnicos vivendo em uma mesma área (25).

O *T. gondii* está associado com o mau desenvolvimento do SNC, podendo causar anomalias congênitas, bem como outras sequelas no SNC, que podem ser precocemente ou tardiamente observadas em crianças e adultos que foram expostos ao *T. gondii* ainda no útero (3,56,181). Este parasito pode infectar vários tipos de células nervosas e causar alteração de suas funções. Os resultados do presente estudo e aqueles encontrados da literatura evidenciam a predominância dos anticorpos IgG anti- *T. gondii* nos pacientes com transtornos mentais estudados. Alguns autores especulam que esses anticorpos poderiam reagir cruzadamente com os epítomos antigênicos do tecido neural,

resultando em sintomas psiquiátricos (182). Os efeitos da infecção pelo *T. gondii* no cérebro, seja pela ação direta do parasito sobre o SNC e/ou a ação do sistema imune frente à infecção podem resultar em sérias consequências para o hospedeiro.

A presente investigação sugere associação entre a infecção pelo *T. gondii* e transtornos do humor e reforça a necessidade de estudos adicionais para compreender melhor a associação entre a toxoplasmose e os transtornos mentais.

6- CONCLUSÕES

1. Os resultados da pesquisa de DNA do *T. gondii* em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose mostraram que a nPCR apresentou melhor desempenho do que a PCRc, podendo ser uma ferramenta potencialmente útil para a confirmação diagnóstica da neurotoxoplasmose.
2. Os resultados da pesquisa das subclasses da IgG anti-*T. gondii* em amostras de LCR de pacientes com neurotoxoplasmose indicaram predominância dos anticorpos IgG₁ e IgG₂. A alta frequência de detecção de anticorpos IgG₂ encontrada neste trabalho merece ser investigada em adicionais estudos.
3. A pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em pacientes com transtornos mentais mostrou que a prevalência e a concentração dos anticorpos IgG nos soros de pacientes com transtornos do humor foram significativamente maiores do que aquelas encontradas em voluntários sadios. Estes dados reforçam a necessidade de estudos adicionais para compreender melhor a associação entre a toxoplasmose e os transtornos mentais.

7- REFERÊNCIAS

1. Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms roisins) du gondi. C R Hebd Seances Acad Sci. 1908;147:763-6.
2. Splendore A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'umo. Rev Soc Sci São Paulo. 1908;3:109-12.
3. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmouts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J, Wilson CB, Baker MD. Infectious disease of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p.946-1091.
4. Sabin AB, Olitsky PK. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. Science. 1937;85(2205):336-8.
5. Wolf A, Cowen D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. Bull Neurol Inst New York. 1937;6:306-71.
6. Wolf A, Cowen D. Granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan (*Toxoplasma* or *Encephalitozoon*): II. Identification of a case from the literature. Bull Neurol Inst N Y. 1938;7:266-83.
7. Pinkerton H, Weinman RG. *Toxoplasma* infection in man. Acta Pathol. 1940;30:374-92.
8. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Science. 1948;108(2815):660-3.
9. Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1960;46:11-21.
10. Hutchison WM. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature. 1965;206(987):961-2.
11. Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. BioScience. 1973;23(6):343-52.

12. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998;11(2):267-99.
13. Gross U, Holpert M, Goebel S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. Ann Ist Super Sanita. 2004;40(1):65-70.
14. Dubey JP, Beattie CT. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press; 1988. p.232.
15. Dubey JP. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. Parasitology. 1997;115(Pt 1):15-20.
16. Dubey JP. The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. In Ambroise-Thomas P, Petersen E. Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Paris: Springer; 2000. p.271-5.
17. Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(2):364-9.
18. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exp Med. 1970;132(4):636-62.
19. Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M. Soil survival of *Toxoplasma gondii* in Kansas and Costa Rica. Am J Trop Med Hyg. 1975;24(3):439-43.
20. Yilmaz SM, Hopkins SH. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol. 1972;58(5):938-9.
21. Frenkel JK, Dubey JP. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. J Parasitol. 1973;59(3):587-8.
22. Wainwright KE, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Melli AC, Essert T, et al. Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. J Parasitol. 2007;93(4):925-31.

23. Dubey JP. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol.* 1996;64(1-2):65-70.
24. Dumètre A, Dardé ML. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(5):651-61.
25. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1217-58.
26. Desmonts G, Couvreur J. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med.* 1974;50(2):146-59.
27. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis.* 2009;199(2):280-5.
28. Valdès V, Legagneur H, Watrin V, Paris L, Hascoët JM. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *Arch Pediatr.* 2011;18(7):761-3.
29. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet.* 1997;350(9072):173-7.
30. Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):55-62.
31. Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C, et al. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *J Infect Dis.* 2010;202(8):1226-33.
32. Kravetz JD, Federman DG. Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: knowledge of risk factors. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005;13(3):161-5.

33. Eichenwald H. Experimental toxoplasmosis; transmission of the infection in utero and through the milk of lactating female mice. *Am J Dis Child.* 1948;76(3):307-15.
34. Mayer H. Investigaciones sobre toxoplasmosis. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1965; 58(6):485-97.
35. Rommel M, Breuning J. Research into the occurrence of *Toxoplasma gondii* in the milk of some animals and the possibility of lactogenous infection. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1967;80(19):365-9.
36. Sanger VL, Chamberlain DM, Chamberlain KW, Cole CR, Farrell RL. Toxoplasmosis. V. Isolation of *Toxoplasma* from cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1953;123(917):87-91.
37. Sanger VL, Cole CR. Toxoplasmosis. VI. Isolation of *Toxoplasma* from milk, placentas, and newborn pigs of asymptomatic carrier sows. *Am J Vet Res.* 1955;16(61 Part 1):536-9.
38. Langer H. Repeated congenital infection with *Toxoplasma gondii*. *Obstet Gynecol.* 1963;2:318-29.
39. Riemann HP, Meyer ME, Theis JH, Kelso G, Behymer DE. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *J Pediatr.* 1975;87(4):573-6.
40. Sacks JJ, Roberto RR, Brooks NF. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *JAMA* 1982; 248(14):1728- 32.
41. Brooks RG, Remington JS. Transplant-related infections. In: Bennet JV, Brachman PS. *Hospital infections.* 2nd ed. Boston: Little, Brown and Co; 1986.p.581-618.
42. Israelski DM, Remington JS. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. *Curr Clin Top Infect Dis.* 1993;13:322-56.
43. Siegel SE, Lunde MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, et al. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood.* 1971;37(4):388-94.
44. Räisänen SA. The importance of trophozoites in transmission of toxoplasmosis: survival and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* trophozoites in liquid media. *Med Hypotheses.* 1978;4(4):367-75.

45. Remington JS, Gentry LO. Acquired toxoplasmosis: infection versus disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1970;174(2):1006-17.
46. Herwaldt BL, Juranek DD. Laboratory-acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis, and toxoplasmosis. *Am J Med Trop Hyg.* 1993;48(3):313-23.
47. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):659-88.
48. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(10):634-40.
49. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004;363(9425):1965-76.
50. Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev.* 2011;240(1):269-85.
51. Nunura J, Vásquez T, Endo S, Salazar D, Rodriguez A, Pereyra S, et al. Disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent patient from Peruvian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010;52(2):107-10.
52. Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis.* 1996;23(2):277-82.
53. Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D, Bowie WR. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology.* 1998;105(6):1032-7.
54. McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis. *Clin Infect Dis.* 1994;18(1):38-72.
55. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* 1999;353(9167):1829-33.

56. Dukes C, Luft B, Durak D. Toxoplasmosis. In: Scheld WM, Whitley RJ, Durack DT. Infectious of the central nervous system. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.p.785-806.
57. Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP Jr., Liu L, Babulas VP, Susser ES. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry*. 2005;162(4):767-73.
58. Horowitz SL, Bentson JR, Benson F, Davos I, Pressman B, Gottlieb MS. CNS toxoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Neurol*. 1983;40(10):649-52.
59. Holliman RE. Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. *J Infect*. 1988;16(2):121-8.
60. Jones JL, Hanson DL, Chu SY, Ciesielski CA, Kaplan JE, Ward JW, et al. Toxoplasmic encephalitis in HIV-infected persons: risk factors and trends. The adult/adolescent spectrum of disease group. *AIDS*. 1996;10(12):1393-9.
61. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmosis of the central nervous system. In: Remington JS, Swartz MN. *Curr Top Infect Dis*. Vol 6. New York: McGraw-Hill; 1985.p.315-58
62. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992; 15(2):211-22.
63. Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol*. 2002;168(6):2988-96.
64. Suzuki Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis*. 2002;185(Suppl 1):S58-65.
65. Hamilton RG. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin Chem*. 1987;33(10):1707-25.

66. Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* 2007;29(12):651-60.
67. Amato Neto V, Baroni AA. Toxoplasmose. In: Amato Neto V, Syschek RCB, Amato VS, Tuon FF. *Parasitologia uma abordagem clínica.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.p.149-166.
68. Hegab SM, Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clin Exp Med.* 2003;3(2):84-105.
69. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2002;185(Suppl 1):S73-82.
70. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immun.* 2010;125(2 suppl 2):S41-52.
71. Derouin F, Sulcebe G, Ballet JJ. Sequential determination of IgG subclasses and IgA specific antibodies in primary and reactivating toxoplasmosis. *Biomed Pharmacother.* 1987;41(8):429-33.
72. Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol.* 1989;27(9):2031-8.
73. Ee TY, Singh M, Yap EH. The determination of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in different IgG subclasses of human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1989;20(1):71-9.
74. Cañedo-Solares I, Galvan-Ramirez Mde L, Luna-Pasten H, Rodriguez Perez LR, Ortiz-Alegria LB, Rico-Torres CP, et al. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(5):469-74.
75. Mack DG, Mcleod R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. *J Clin Invest.* 1992;90(6):2585-92.

76. Ege MJ, Herzum I, Buchele G, Krauss-Etschmann S, Lauener RP, Bitter S, et al. Specific IgE to allergens in cord blood is associated with maternal immunity to *Toxoplasma gondii* and rubella virus. *Allergy*. 2008;63(11):1505-11.
77. Vouldoukis I, Mazier D, Moynet D, Thiolat D, Malvy D, Mossalayi MD. IgE mediates killing of intracellular *Toxoplasma gondii* by human macrophages through CD23-dependent, interleukin-10 sensitive pathway. *PLoS One*. 2011;6(4):e18289.
78. Camargo ME. Toxoplasmose In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.p.278-88.
79. Ho-Yen DO. Toxoplasmosis. *Medicine*. 2005;33(5):120-1.
80. Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1964;6(3):117-8.
81. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J Clin Pathol*. 1976;29(2):150-3.
82. Walls KW, Bullock SL, English DK. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1977;5(3):273-7.
83. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):941-5.
84. Nascimento FS, Suzuki LA, Rossi CL. Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. *Prenat Diagn*. 2008;28(8):749-52.
85. Suzuki LA, Rocha RJ, Rossi CL. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Med Microbiol*. 2001;50(1):62-70.
86. Jones J, Lopez A, Wilson M. Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician*. 2003;67(10):2131-8.

87. Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol.* 1997;35(1):174-8.
88. Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 1997;35(12):3112-5.
89. Gavinet MF, Robert F, Firtion G, Delouvrier E, Hennequin C, Maurin JR, et al. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol.* 1997;35(5):1276-7.
90. Montoya JG, Liesenfeld O, Kinney S, Press C, Remington JS. Vidas test for avidity of *Toxoplasma*-specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant woman. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2504-8.
91. Beazley DM, Egerman RS. Toxoplasmosis. *Semin Perinatol.* 1998; 22(4):332-8.
92. Spalding SM, Amendoeira MRR, Ribeiro LC, Silveira C, Garcia AP, Camillo-Coura L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(4):483-91.
93. Ashburn D, Joss AWL, Pennington TH, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of *Toxoplasma* infection in pregnancy? *J Clin Pathol.* 1998;51(4):312-5.
94. Pinon JM, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A, et al. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28(8):1739-43
95. Wong SY, Hajdu MP, Ramirez R, Thulliez P, McLeod R, Remington JS. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):2952-9.

96. Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2421-6.
97. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. J Clin Microbiol. 2002;40(12):4499-503.
98. Cohen BA. Neurological manifestations of toxoplasmosis in AIDS. Semin Neurol. 1999;19(2):201-11.
99. Luft BJ, Chua A. Central nervous system toxoplasmosis in HIV pathogenesis, diagnosis, and therapy. Curr Infect Dis Rep. 2000;2(4):358-62.
100. Vidal JE, Colombo FA, de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. J Clin Microbiol. 2004;42(10):4765-8.
101. Contini C. Clinical and diagnostic management of toxoplasmosis in the immunocompromised patient. Parasitologia. 2008;50(1-2):45-50.
102. Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. Schizophr Bull. 2007;33(3):745-51.
103. Lüder CG, Giraldo-Velásquez M, Sendtner M, Gross U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. Exp Parasitol. 1999;93(1):23-32.
104. da Silva RC, Langoni H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. Parasitol Res. 2009;105(4):893-8.
105. Blader IJ, Manger ID, Boothroyd JC. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. J Biol Chem. 2001;276(26):24223-31.

106. Kim L, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 10):2119-26.
107. Carmen JC, Hardi L, Sinai AP. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell Microbiol.* 2006;8(2):301-15.
108. Lieberman LA, Banica M, Reiner SL, Hunter CA. STAT1 plays a critical role in the regulation of antimicrobial effector mechanisms, but not in the development of Th1-type responses during toxoplasmosis. *J Immunol.* 2004;172(1):457-63.
109. McKee AS, Dzierszynski F, Boes M, Roos DS, Pearce EJ. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2004;173(4):2632-40.
110. Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML, Pelloux H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* 2008;24(7):299-303.
111. Ferguson DJ, Hutchison WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol Res.* 1987;73(6):483-91.
112. Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA.* 1984;252(7):913-7.
113. Bohne W, Holpert M, Gross U. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology.* 1999;201(2):248-54.
114. Renold C, Sugar A, Chave JP, Perrin L, Delavelle J, Pizzolato G, et al. *Toxoplasma* encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Medicine.* 1992;71(4):224-39.
115. Luft BJ, Conley F, Remington JS, Laverdiere M, Wagner KF, Levine JF, et al. Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in Western Europe and North America. *Lancet.* 1983;1(8328):781-4.

116. Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. Schizophr Bull. 2007;33(3):752-6.
117. Webster JP, McConkey GA. *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: clues as to mechanism of action. Folia Parasitol. 2010;57(2):95-104.
118. House PK, Vyas A, Sapolsky R. Predator cat odors activate sexual arousal pathways in brains of *Toxoplasma gondii* infected rats. PLoS One. 2011;6(8):e23277.
119. Holliman RE. Toxoplasmosis, behaviour and personality. J Infect. 1997;35(2):105-10.
120. Flegel J, Preiss M, Klose J, Havlicek J, Vitáková M, Kodym P. Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis? Biol Psychol. 2003;63(3):253-68.
121. Wang GH, Wang HL, Li QY, Shu C, Jiang MS, Guo Y. Prevalence of *Toxoplasma* infection in first-episode schizophrenia and comparison between *Toxoplasma*-seropositive and *Toxoplasma*-seronegative schizophrenia. Acta Psychiatr Scand. 2006;114(1):40-8.
122. Flegel J, Havlicek J, Kodym P, Maly M, Smahel Z. Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study. BMC Infect Dis. 2002;2(11):1-6.
123. Yerehi K, Balcioglu IC, Ozbilgin A. Is *Toxoplasma gondii* a potential risk for traffic accidents in Turkey? Forensic Sci Int. 2006;163(1-2):34-7.
124. Yuksel P, Alpay N, Babur C, Bayar R, Saribas S, Karakose AR, et al. The role of latent toxoplasmosis in the aetiopathogenesis of schizophrenia - the risk factor or an indication of a contact with cat? Folia Parasitol. 2010;57(2):121-8.
125. Dion S, Barbe PG, Leman S, Camus V, Dimier-Poisson I. Schizophrénie et toxoplasmose. Med Sci. 2009;25(8-9):687-91.
126. Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 1987;44(7):660-9.

- 127.Ledgerwood LG, Ewald PW, Cochran GM. Genes, germs, and schizophrenia: an evolutionary perspective. *Perspect Biol Med.* 2003;46(3):317-48.
- 128.Fuller Torrey F, Rawlings R, Yolken RH. The antecedents of psychoses: a case-control study of selected risk factors. *Schizophr Res.* 2000;46(1):17-23.
- 129.Brown AS. The risk for schizophrenia from childhood and adult infections. *Am J Psychiatry.* 2008;165(1):7-10.
- 130.Yolken RH, Dickerson FB, Fuller Torrey E. *Toxoplasma* and schizophrenia. *Parasite Immunol.* 2009;31(11):706-15.
- 131.Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR, Yolken RH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Bull.* 2007;33(3):729-36.
- 132.Torrey EF, Yolken RH. Could schizophrenia be a viral zoonosis transmitted from house cats. *Schizophr Bull.* 1995;21(2):167-71.
- 133.Jones-Brando L, Torrey EF, Yolken R. Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. *Schizophr Res.* 2003;62(3):237-44.
- 134.Fekadu A, Shibre T, Cleare AJ. Toxoplasmosis as a cause for behaviour disorders - overview of evidence and mechanisms. *Folia Parasitol.* 2010;57(2):105-13.
- 135.Gelder M, Mayon R, Cowen P. Mood disorders. In: *Shorter Oxford Textbook of Psychiatry.* Oxford: Oxford University Press; 2001. p.271-325.
- 136.Harrison PJ. The neuropathology of primary mood disorder. *Brain* 2002; 125(7): 1428-49.
- 137.Kar N, Misra B. *Toxoplasma* seropositivity and depression: a case report. *BMC Psychiatry.* 2004;5(4):1-2.
138. Arling TA, Yolken RH, Lapidus M, Langenberg P, Dickerson FB, Zimmerman SA, et al. *Toxoplasma gondii* antibody titers and history of suicide attempts in patients with recurrent mood disorders. *J Nerv Ment Dis.* 2009;197(12):905-8.

139. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989;27(8):1787-92.
140. Bretagne S, Costa JM, Vidaud M, Nhieu JTV, Fleury-Feith J. Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. J Infect Dis. 1993;168(6):1585-8.
141. Freyre A. Separation of *Toxoplasma* cysts from brain tissue and liberation of viable bradyzoites. J Parasitol. 1995;81(6):1008-10.
142. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
143. Fletcher R, Fletcher S. Clinical Epidemiology: the essentials. 2005. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.p.252.
144. Conover WJ. Practical Nonparametric Statistics. New York: John Wiley & Sons Inc; 1971.p.462.
145. Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons Inc; 1981.p.321.
146. Tabachnick BG, Fidell LS. Using Multivariate Statistics. 4^a ed. Needham Heights: Allyn & Bacon; 2001.p.966.
147. Levy RM, Bredesen DE. Central nervous system dysfunction in acquired immunodeficiency syndrome. J Acquir Immune Defic Syndr. 1982;1(4):41-64.
148. Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart A, et al. A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. AIDS. 1997;11(2):177-84.
149. Leport C, Raffi F, Matheron S, Katlama C, Regnier B, Saimot AG, et al. Treatment of central nervous system toxoplasmosis with pyrimethamine/sulfadiazine combination in

- 35 patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Efficacy of long-term continuous therapy. *Am J Med.* 1988;84(1):94-100.
150. Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1993;329(14):995-1000.
151. Costa JM, Martino R, Held TK, Munoz C, Krüger D, Dardé ML, et al. Quality control for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* reactivation in SCT patients using PCR assays. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(5):527-8.
152. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96 (Suppl 1):S205-15.
153. Alfonso Y, Fraga J, Cox R, Bandera F, Pomier O, Fonseca C, et al. Comparison of four DNA extraction methods from cerebrospinal fluid for the detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in AIDS patients. *Med Sci Monit.* 2008;14(3):MT1-6.
154. Cingolani A, De Luca A, Ammassari A, Murri R, Linzalone A, Grillo R, et al. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. *J Med Microbiol.* 1996;45(6):472-6.
155. Gianotti N, Cinque P, Castagna A, Novati R, Moro M, Lazzarin A. Diagnosis of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. *AIDS.* 1997;11(12):1529-30.
156. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci.* 2001;184(2):101-22.
157. McHugh TD, Bathgate T, Mangan J, Johnson JD, Holliman RE, Butcher PD. Recognition of tissue cyst-specific antigens in reactivating toxoplasmosis. *J Med Microbiol.* 1997;46(7):587-95.
158. Smith JE, McNeil G, Zhang YW, Dutton S, Biswas-Hughes G, Appleford P. Serological recognition of *Toxoplasma gondii* cyst antigens. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;219:67-73.

159. Machala L, Malý M, Hrdá S, Rozsypal H, Stanková M, Kodým P. Antibody response of HIV-infected patients to latent, cerebral and recently acquired toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(2):179-82.
160. Gazzinelli RT, Bala S, Stevens R, Baseler M, Wahl L, Kovacs J, et al. HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines. *J Immunol*. 1995;155(3):1565-74.
161. Giraldo M, Cannizzaro H, Ferguson MA, Almeida IC, Gazzinelli RT. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1453-60.
162. Debierre-Grockiego F, Schwarz RT. Immunological reactions in response to apicomplexan glycosylphosphatidylinositols. *Glycobiology*. 2010;20(7):801-11.
163. Barrett DJ, Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol*. 1986;63(1):127-34.
164. Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Herz U, Heeg K, Werfel T, et al. Deficiency in immunoglobulin G2 antibodies against staphylococcal enterotoxin C1 defines a subgroup of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(3):274-81.
165. Persson MA, Brown SE, Steward MW, Hammarström L, Smith CI, Howard CR, et al. IgG subclass-associated affinity differences of specific antibodies in humans. *J Immunol*. 1988;140(11):3875-9.
166. Siber GR, Schur PH, Aisenberg AC, Weitzman SA, Schiffman G. Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med*. 1980;303(4):178-82.
167. Garraud O, Nkenfou C, Bradley JE, Perler FB, Nutman TB. Identification of recombinant filarial proteins capable of inducing polyclonal and antigen-specific IgE and IgG4 antibodies. *J Immunol*. 1995;155(3):1316-25.

168. Garraud O, Perraut R, Riveau G, Nutman TB. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. *Trends Parasitol.* 2003;19(7):300-4.
169. Coppin A, Dzierszinski F, Legrand S, Mortuaire M, Ferguson D, Tomavo S. Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie.* 2003 85(3-4):353-61.
170. Torrey EF, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(11):1375-80.
171. Yolken RH, Bachmann S, Ruslanova I, Lillehoj E, Ford G, Torrey EF, et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in individuals with first-episode schizophrenia. *Clin Infect Dis.* 2001;32(5):842-4.
172. Leweke FM, Gerth CW, Koethe D, Klosterkötter J, Ruslanova I, Krivogorsky B, et al. Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2004;254(1):4-8.
173. Mortensen PB, Norgaard-Pedersen B, Waltoft BL, Sorensen TL, Hougaard D, Yolken RH. Early infections of *Toxoplasma gondii* and the later development of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2007;33(3):741-4.
174. Zhu S. Psychosis may be associated with toxoplasmosis. *Med Hypotheses.* 2009;73(5):799-801.
175. Prandovszky E, Gaskell F, Martin H, Dubey JP, Webster JP, McConkey GA. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. *PloS One.* 2011;6(9):e23866.
176. Cetinkaya Z, Yazar S, Gecici O, Namli MN. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in patients with schizophrenia-preliminary findings in a Turkish sample. *Schizophr Bull.* 2007; 33(3):789-91.
177. Tamer GS, Dunder D, Yalug I, Caliscan S, Yazar S, Aker A. The schizophrenia and *Toxoplasma gondii* connection: infectious, immune or both? *Adv Ther.* 2008;25(7): 703-9.

178. Hamidinejat H, Ghorbanpoor M, Hosseini H, Alavi SM, Nabavi L, Jalali MH, et al. *Toxoplasma gondii* infection in first-episode and inpatient individuals with schizophrenia. *Int J Infect Dis*. 2010;14(11):e978-81.
179. Alvarado-Esquivel C, Urbina-Álvarez JD, Estrada-Martínez S, Torres-Castorena A, Molotla-de-León G, Liesenfeld O, et al. *Toxoplasma gondii* infection and schizophrenia: a case control study in a low *Toxoplasma* seroprevalence Mexican population. *Parasitol Int*. 2011;60(2):151-5.
180. Yuksel P, Alpay N, Babur C, Bayar R, Saribas S, Karakose AR, et al. The role of latent toxoplasmosis in the aetiopathogenesis of schizophrenia--the risk factor or an indication of a contact with cat? *Folia Parasitol*. 2010;57(2):121-8.
181. Bale JF Jr., Murph JR. Congenital infections and the nervous system. *Pediatr Clin North Am*. 1992;39(4):669-90.
182. Pedersen MG, Stevens H, Pedersen CB, Norgaard-Pedersen B, Mortensen PB. *Toxoplasma* infection and later development of schizophrenia in mothers. *Am J Psychiatry*. 2011;168(8):814-2.