UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Ciências Biomédicas

Imunidade Humoral

na Toxoplasmose Ocular

Tese apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências na área de Imunologia.

Lília Rios Tsukuda

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

São Paulo

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): **Lilia Rios Tsukuda**.

Título da Tese: Imunidade humoral na toxoplasmose ocular.

Orientador(a): Luiz Vicente Rizzo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Ciências Biomédicas

Imunidade Humoral

na Toxoplasmose Ocular

Tese apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências na área de Imunologia.

Lília Rios Tsukuda

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

São Paulo

2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Tsukuda, Lilia Rios.
Imunidade humoral na toxoplasmose ocular / Lilia Rios Tsukuda. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Luiz Vicente Rizzo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia da infecção pelo T. gondii.

Versão do título para o inglês: Humoral immune response in ocular Toxoplasmosis.

Descritores: 1. *Toxoplasma gondii* 2. Toxoplasmose ocular 3. Anticorpos 4. Formação de anticorpos 5. Retinocoroidite 6. Sorotipagem do *Toxoplasma gondii* I. Rizzo, Luiz Vicente II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB169/2007

Este trabalho foi desenvolvido no "Laboratório de Imunologia Clínica" do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com bolsa da FAPESP (03/08586-2) e no "Laboratório de Parasitologia Molecular" do Departamento de Microbiologia e Imunologia da *University of British Columbia* – Vancouver – Canadá com bolsa da CAPES (PDEE: 1194 -05-4).

Resumo

O Toxoplasma gondii é um protozoário amplamente disseminado pelo mundo que pode causar doença em animais e seres humanos. A prevalência varia geograficamente. Em Erechim, Rio Grande do Sul - Brasil, 88% da população é soropositiva e a toxoplasmose ocular acomete 18% destes indivíduos. A evolução e a gravidade da doença dependem de características genéticas do parasita e do hospedeiro. A maioria dos isolados do *T. gondii* é classificado em uma das três linhagens clonais distintas (tipo I, II e III). Epitopos polimórficos destas linhagens são altamente imunogênicos. A resposta imune humoral contra *T. gondii* é cepa-específica e persistente em todas as fases da infecção. O objetivo deste estudo foi correlacionar a imunidade humoral e a resposta contra peptídeos cepa-específicos com a gravidade da toxoplasmose ocular em pacientes de Erechim. Foram analisadas pelo método de ELISA 322 amostras de soro de indivíduos em diferentes fases da infecção, com ou sem lesão ocular, para a pesquisa dos isótipos específicos e contra peptídeos recombinantes de regiões polimórficas (GRA6 e GRA7) do parasita. Nossos dados mostram que IgG1 é a subclasse predominante em todos os grupos analisados; IgG2 e IgG3, além de IgA e IgE, estão associados à infecção adquirida recente; seis diferentes padrões sorotípicos do *T. gondii* parecem infectar esta população, sendo o sorotipo I/III detectado em grande parte dos pacientes sem lesão ocular, enquanto o sorotipo Atípico D foi detectado em 60% dos pacientes com a forma grave da doença. Embora não tenha sido observada associação entre os isótipos e a evolução clínica da TO, a utilização da análise sorológica com peptídeos cepa-específicos, além de sugerir a diversidade de cepas presentes nesta população, pode ser útil como marcador para o prognóstico da toxoplasmose ocular.

Abstract

Toxoplasma gondii is a widespread protozoan parasite associated with a large spectrum of pathology in both humans and animals. Prevalence varies with geography. In the city of Erechim, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, prevalence of the disease is 88% and related with a high incidence (18%) of ocular toxoplasmosis (OT). The progression and severity of the disease is quite variable probably due to some combination of host and parasite genetics. Most of *T. gondii* strains are classified in one of three distinct clonal lineages (type I, II, III). Strain polymorphic epitopes are highly immunogenic. The humoral immune response against *T. gondii* is strain-specific and effective at all stages of infection. The aim of this study was to correlate the humoral immunity and response against strain-specific peptides with the severity of OT in Erechim`s patients. Sera of 322 individuals in different stages of infection, with or without ocular lesion, were evaluated by ELISA to specific isotypes, IgG avidity and serotyped with strain-specific polymorphic peptides (GRA6 and GRA7). Our results show that IgG1 was predominant in all clinical groups, whereas IgA, IgE, IgG2 and IgG3 were associated with recent acquired infection. Our data identified six serotypes, four of which were new. One of the atypical serotypes was strongly associated with severe ocular disease in 60% of these patients and serotype I/III was detected in the majority of the patients without ocular toxoplasmosis. Although there was no association between isotypes and the clinical evolution of OT, serological analysis with strain-specific peptides suggest that divergent T. *gondii* strains have been infecting Erechim`s population. Moreover, this methodology may be useful as a prognostic marker of the ocular toxoplasmosis.

Dedicatória

Senhor!

É hora de dizer muito obrigada!

Mais uma etapa vencida, mais um trabalho cumprido, e acima de tudo, mais um sonho realizado, ou por que não ratificar, vários sonhos realizados?

Quantas coisas apreendi, quantos obstáculos superei, errei, chorei e sorri! Aprendi a valorizar pequenas coisas, a olhar o tudo e o nada, e a ver a complexidade do mais simples e a simplicidade do mais complexo. É senhor, parece que entendi o que é ser Cientista!

Obrigada senhor, por todos que você colocou no meu caminho nesta jornada. Quantos amigos conquistei e quantos me conquistaram! A amizade perdida, pelas circunstâncias da vida, também quero agradecer, pois também foi muito especial.

Em todo este tempo de trabalho, meu Grande Amigo, compreendi que não precisamos de grandes coisas para buscar os nossos objetivos, basta que tenhamos dedicação, respeito, fé e amor pelo que fazemos. E por falar em AMOR, Senhor, queria lhe falar mais um muito obrigada, por meus amores incondicionais – Silvio, meu marido, e Edileuza, minha mãe, aos quais eu dedico este trabalho.

Lília Rios Tsukuda

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luiz Vicente Rizzo, pela oportunidade, confiança, credibilidade, amizade e por todos os ensinamentos como pessoa e cientista;

Ao Dr. Michael E. Grigg por todos os ensinamentos e pela receptividade em seu laboratório no University of British Columbia na Canadá;

Ao Dr. Cláudio Silveira e toda equipe da Clínica Silveira pelos ensinamentos e dedicação para a realização deste estudo, sem o trabalho de vocês muito menos se saberia sobre a toxoplasmose;

Ao oftalmologista Dr. Rubens Belfort Junior pela análise e caracterização clínicas dos pacientes;

Aos Doutores Regina D`Lucca, Heitor Penna e Karina Bastos pelas sugestões, elogios e críticas na banca de qualificação do doutorado;

Às Cientistas e amigas queridas, com as quais tanto aprendi nestes anos, Dra. Luciana de Moraes (Lu de Deus) e Dra. Alessandra Commodaro (Ale), muito obrigada pelas colaborações, ensinamentos e amizade;

À Professora e tia amada Cleuza Carneiro pela revisão deste trabalho;

À mestranda e amiga Natália Oliveira a quem ensinei e aprendi e que colaborou diretamente deste estudo;

À amiga Cristina, técnica do laboratório, pela sua competência e disponibilidade;

À Dra. Adriana Lima Vallochi que iniciou esta linha de pesquisa em nosso laboratório;

Aos amigos queridos do Laboratório de Imunologia Clínica, Jean Pierre, Ivo Marguti, Tatiana Takeshi, Julieta Jenre, Thais Boccia, Cris Moulin e Áurea. E aqueles que não fazem mais parte do grupo, mas continuam fazendo parte desta história, Gisele Baracho, Angela Falcai, Rafael Larocca e Ulisses Rodrigues, tenham certeza que aprendi muito com cada um de vocês;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Prof. Dr. Michael Grigg, Erick James, Emily Jansen, Vanessa Lloyd, June Po e Amandeep Nandra com os quais partilhei momentos de muito crescimento pessoal e científico.

Ao Prof. João Gustavo Mendes e todos do seu laboratório, Ricardo Weilinch, Jaqueline, Ana Elisa, Fabiola, Claudinha, Janine, Welbert e Daniel pela excelente convivência nestes anos.

Às secretarias e amigas Jothelma e Valéria e toda equipe de funcionários do ICB.

A todos os professores e colegas com os quais aprendi algo, quer seja nos cursos realizados, quer seja na convivência durante estes anos de doutorado, meu muito obrigada;

Às minhas irmãs queridas, Cíntia e Leila, que sempre contribuíram de forma especial em tudo em minha vida, tenham todo o meu amor.

E, a você, que leu toda esta parte de agradecimentos e não encontrou o seu nome, minhas sinceras desculpas e meu muito obrigado.

Abreviaturas

DNA	Ácido desoxiribonucléico
D.O.	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do Inglês: *Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay)*
GRA	Proteína do grânulo denso (do inglês: *Granule dense protein*
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
M	Molar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: *Major Histocompatobility complex*
N	Normalidade
NK	Célula matadora natural (do inglês*: natural killer)*
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFPL	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism)*
Stag	Antígeno de superfície do *T. gondii*
SAG	Antígeno de superfície do *T. gondii (do inglês: surface antigen)*
TMB	3,3',5,5' tetra-metilbenzidina
TO	Toxoplasmose ocular
μg	microgramas
μl	microlitros

Sumário

1. INTRODUÇÃO

1.1. O parasito..... 12

1.2. Transmissão e Epidemiologia 15

1.3. Características genéticas do parasita 19

1.4. Manifestações Clínicas da toxoplasmose 25

1.5. Resposta imune ao *T. gondii* 32

1.6. Diagnóstico da toxoplasmose 40

1.7. Tratamento da toxoplasmose 42

2. OBJETIVOS 45

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística 46

3.2. Reagentes e antígenos 50

3.2.1. Antígenos do *Toxoplasma gondii* 50

3.2.2. Reagentes 51

3.3. Separação do plasma e PBMCs 51

3.4. Ensaios imunoenzimáticos para pesquisa dos isótipos 52

3.5. Definição do índice de avidez de IgG 56

3.6. Análise sorotípica de cepas do *T. gondii* 57

3.6.1. Sequência dos peptídeos 57

3.6.2. Ensaios imunoenzimáticos cepa-específicos 59

3.6.3. Normalização dos resultados 60

3.7. Análise Estatística 61

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da imunidade humoral na toxoplasmose ocular 62

4.1.1. Características da população estudada 62

4.1.2. Correlação entre os isótipos e a toxoplasmose ocular 66

4.1.3. Determinação do índice de avidez 71
4.1.4. Associação entre IgA, faixa etária e a lesão ocula 75
4.1.5. Evolução clínica de pacientes com toxoplasmose 76
4.2. Análise sorotípica do *T. gondii* 77
4.2.1. Novos padrões sorotípicos na população de Erechim 77
4.2.2. Associação entre sorotipos e a toxoplasmose ocular 82
4.2.3. Atípicos sorotipos em surtos no Sul do Brasil 86

5. DISCUSSÃO 88

6. CONCLUSÕES 110

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 111

8. ANEXOS 127
8.1. Anexo A: Consentimento informado 127
8.2. Anexo B: Descrição da população estudada 131
8.3. Anexo C: Definição do valor de corte do ELISA dos isótipos 137
8.4. Anexo D: Definição do valor de corte do ELISA dos sorotipos 138
8.5. Anexo E: Análise da sensibilidade e especificidade dos ELISAs ..139

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Parasito

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório, capaz de infectar e replicar dentro de qualquer célula nucleada de animais homeotérmicos (WON e REMINGTON, 1993; DUBEY, 1998). Foi descrito em 1908 no Brasil por Splendore, a partir de coelhos (SPLENDORE, 1908) e, no mesmo ano, na Tunísia por Nicole e Manceaux, em formas oriundas do roedor *Ctenodatylus gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1908). Esse protozoário que pertence ao Filo Apicomplexa, subclasse Coccídea, tem extrema importância médica e veterinária (LEVINE *et al.*, 1977; TENTER *et al.*, 2000).

T. gondii possui o ciclo de vida heteroxênico facultativo com três estágios de vida infectantes: esporozoítas (presentes nos oocistos), bradizoítas (formando cistos teciduais) e taquizoítas (intra e extracelulares). Estas formas evolutivas compõem um complexo ciclo envolvendo hospedeiros definitivos e intermediários (DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998) (**Figura 1**).

O ciclo sexuado ocorre apenas no intestino de membros da família Felidae, que são os hospedeiros definitivos. Após a ingestão de tecidos contendo cistos, os bradizoítas liberados invadem os enterócitos, multiplicam-se por uma série de esquizogonias, e se diferenciam em gametas masculinos e femininos. A fusão do micro e macrogameta resulta na formação de um zigoto diplóide (oocisto) que é liberado no ambiente,

juntamente com as fezes, onde se divide em oito progênies haplóides denominadas esporozoítas, as quais são formas infectantes para os hospedeiros susceptíveis (DUBEY *et al.*, 1970; SIBLEY *et al.*, 1992; WONG e REMINGTON, 1993). Os gatos podem infectar-se também através da ingestão de oocistos esporulados liberados nas fezes de outros gatos (DUBEY, 1998; 2002). Após a esporulação, os esporozoítas podem ser ingeridos por outros mamíferos (incluindo o homem), transformando-se em taquizoítas (DUBEY, MILLER e FRENKEL, 1970; FRENKEL, 1973).

A forma taquizoíta mede cerca de 2 a 6 μm de comprimento, tem formato de meia-lua, apresentando a região anterior afilada e a posterior recurvada. Corresponde ao estágio de multiplicação rápida do parasito, tanto em células do hospedeiro intermediário, quanto em células epiteliais intestinais do hospedeiro definitivo (SHEFFIELD e MELTON, 1968; KOHLER *et al*., 1997). Esta forma tem a capacidade de entrar em todas as células nucleadas por penetração ativa e formar um vacúolo parasitóforo (DOBROWOLSKI e SIBLEY, 1996). A propagação dos taquizoítas ocorre pelo rompimento das células infectadas e invasão de células adjacentes ou por via hematogênica, contaminando principalmente o sistema nervoso central, musculatura esquelética e cardíaca. Como o *T. gondii* pode invadir todas as células e tecidos do organismo, sua disseminação se estende por todo o corpo do hospedeiro (WONG e REMINGTON, 1994). Esse estágio proliferativo caracteriza a fase aguda da infecção.

A entrada do *T. gondii* na célula do hospedeiro é um processo ativo, envolvendo filamentos de actina e miosina do parasito e certas proteínas transmembrânicas que se ligam a estes filamentos. A invasão do parasita é semelhante à fagocitose, embora seja um processo mais rápido e polarizado, pois ocorre a partir da região apical do parasita (HIRAI, HIRATO e YANAGAWA, 1966; AJIOKA *et al.*, 1998), que atravessa a membrana da célula do hospedeiro. Enquanto a fagocitose é lenta e depende do rearranjo do citoesqueleto (JONES, YEH e HIRSCH, 1972; AIKAWA *et al.*, 1977)

A proliferação dos taquizoítas diminui com o estabelecimento da resposta imune do hospedeiro, contudo àqueles que escapam, evoluem para a forma bradizoíta e, juntamente com proteínas do hospedeiro, formam os cistos teciduais, os quais são incapazes de induzir inflamação (HUNTER e REMINGTON, 1994). Há um equilíbrio dinâmico entre o parasita e o hospedeiro, instalando-se assim a infecção crônica ou latente (DENKERS, 2003). Os cistos teciduais alojam-se, basicamente, no sistema nervoso central, musculaturas esquelética e cardíaca e retina (JACOBS *et al.*, 1960; ISRAELSKI *et al.*, 1989).

Sob determinadas condições, os bradizoítas, contidos nos cistos teciduais, podem retornar às formas proliferativas – taquizoítas, reiniciando o ciclo de parasitemia. Ainda hoje, são desconhecidos os fatores que induzem esta mudança nos bradizoítas a reiniciar o ciclo assexuado. Em outros membros dos *Coccidia*, somente os esporozoítas, provenientes do ciclo

sexuado, possuem essa capacidade (Dubey, 1970). Todavia, esta capacidade de interconversão do *T. gondii*, alarga as fontes de infecção para o homem, dando a este protozoário notável importância em problemas da saúde humana (LYONS, McLOEOD e ROBERTS, 2002).

1.2. Transmissão e Epidemiologia

A infecção pode ser adquirida por diversas formas, sendo que a via oral é a mais importante forma de contaminação. Deste modo, os hospedeiros podem infectar-se das seguintes maneiras: a) ingestão do oocisto, através de frutas, verduras, legumes, água ou pelo contato com o solo; b) ingestão de cistos teciduais, presentes em alimentos crus ou mal-cozidos; c) ingestão de taquizoítas, através do leite não pasteurizado, ovos, saliva, perdigotos, transfusões sanguíneas e órgãos transplantados (BONAMETTI *et al.*, 1997; GARCIA *et al.*, 2003; MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

A transmissão congênita é uma das formas mais importantes de infecção. A gestante transmite a infecção para o feto quando se infecta durante a gestação, através da passagem dos taquizoítas pela barreira placentária (**FIGURA 1**). O parasito pode causar diferentes graus de gravidade dependendo da virulência da cepa, da capacidade de resposta imune da mãe e da idade gestacional (AJZENBERG *et al.*, 2002).

Infecções causadas pelo *T. gondii* estão amplamente distribuídas atingindo um terço da população mundial (TENTER, HECKEROTH e WEISS,

2000). A prevalência da infecção varia com a região geográfica e a faixa etária (DUBEY, 2004). Entre norte-americanos aproximadamente 15% da população está cronicamente infectada (JONES *et al.*; 2001). Nas Américas Central e Sul e na Europa continental estima-se que a prevalência alcance 50-80% (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER *et al.*, 2000). Em regiões específicas do Brasil e França as taxas de soroprevalência atingem índices extremamente elevados e pouco comuns, de aproximadamente 88% (GLASNER *et al.*, 1992). Devido à incidência da doença ser tão variável, ressalta a necessidade de investigar a dinâmica da transmissão e/ou as características das cepas do parasita que causam doença em comunidades susceptíveis, como no Brasil, sobretudo na região Sul, na cidade de Erechim.

Erechim é um município localizado no Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, na região do Alto Uruguai, sobre a cordilheira da Serra Geral. Colonizado basicamente por quatro etnias, polonesa, italiana, alemã e israelita, o povoado se formou em 1908, à margem da estrada de ferro. Ocupa uma área de 430,764 km^2 com uma população de cerca de 98.288 habitantes (IBGE, 2005). A economia da região é basicamente focada na pecuária, especialmente suínos, agricultura e o comércio local. Diveros estudos vêm sendo realizados com o intuíto de entender a elevada prevalência da toxoplasmose (88%) e, sobretudo, a alta incidência (18%) da forma ocular da doença nesta região (SILVEIRA *et al.*, 1988; GLASNER *et al.*, 1992; SILVEIRA *et al.*, 2001)

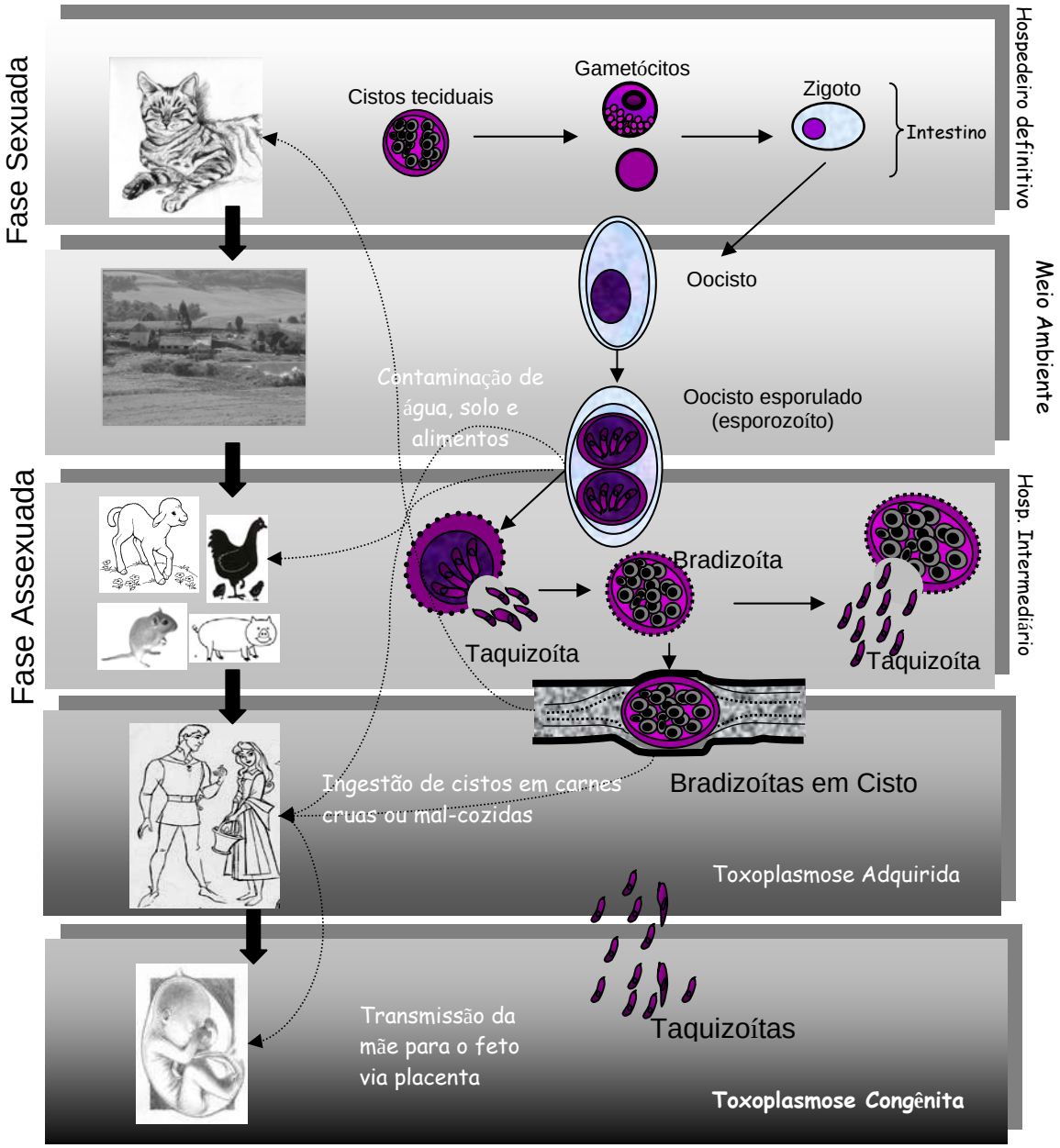


Figura 1. **Ciclo evolutivo do *Toxoplasma gondii***. O ciclo sexuado ocorre exclusivamente no intestino do hospedeiro definitivo - felinos. Após a ingestão de bradizoítas, na forma de cistos teciduais, o parasita invade os enterócitos, sofre processos de divisão celular até formar macro e microgametócitos. Os gametócitos fundem-se para formar o zigoto ou oocisto, que são liberados no meio ambiente na pelas fezes do gato. O oocisto no ambiente, através de meioses, evolui à forma de esporozoíta, que é resistente por anos num ambiente úmido e infectante. Uma vez ingerido, por um hospedeiro intermediário, o esporozoíto se diferencia à forma de taquizoíta, extremamente proliferativa, a qual estabelece a infecção aguda. Passada a fase aguda, os taquizoítas evoluem num lento processo de divisão para a forma de bradizoíta. Neste estágio, o parasita pode permanecer latente por toda vida do hospedeiro na forma de cisto tecidual, ou pode ser transmitido por carnivorismo para outros hospedeiros, inclusive o gato, reiniciando o ciclo. Durante a infecção aguda, os taquizoítas podem ser transmitidos da mãe para o feto, levando à toxoplasmose congênita (Baseado em Dubey, 1986).
As linhas sólidas indicam os processos de diferenciação do parasita e as linhas pontilhadas indicam os modos de transmissão.

Através de estudo de caso-controle realizado em Erechim foram verificados os principais fatores de risco e fontes de infecção do *T. gondii* (**Figura 2**). Os dados do estudo apontam o contato direto no solo, seja ele no campo ou em jardinagem domiciliar, e o hábito de comer carne de suínos e ovinos mal-cozida, como principais fontes de infecção associadas às infecções recentes. A pesquisa também revela que há maior soroprevalência entre adultos e crianças do sexo masculino, mulheres multíparas e na população da zona rural. Entre os indivíduos domiciliados na zona urbana foi verificada baixa associação com a infecção (JONES *et al.*, 2006). É provável que as campanhas de saúde pública estejam educando e conscientizando a população urbana, minimizando a exposição ao parasita.

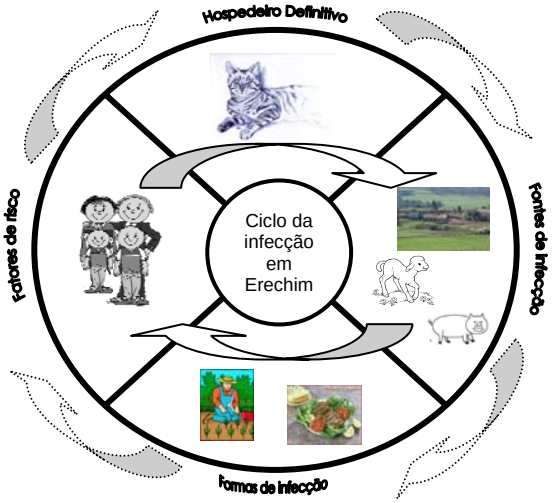


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo da infecção pelo *T. gondii* em Erechim. Seres humanos se infectam principalmente pelo contato com o solo e pela ingestão de carnes, frutas, legumes e verduras cruas ou mal-cozidas, sendo a contaminação oral a principal via de infecção. O ciclo de transmissibilidade parece ser independente da fase sexuada, que ocorre nos felinos (setas cheias),. Mulheres multíparas e indivíduos do sexo masculino, adultos e crianças, estão mais expostos à infecção (Baseado em Jones *et al.*, 2006).

1.3 Características genéticas do parasita

Ainda que a infecção pelo *T. gondii* seja amplamente disseminada pelo mundo, da grande variedade de hospedeiros intermediários e da capacidade do parasita em se reproduzir sexualmente, análises filogenéticas revelaram resultados surpreendentes. Este bem-sucedido parasita possui uma incomum estrutura populacional, consistindo de três linhagens clonais, denominadas Tipo I, II ou III, as quais foram detectadas em 94% dos isolados da Europa e na América do Norte (HOWE e SIBLEY, 1995), diferindo-se geneticamente entre si em apenas 1% ou menos (SU *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm postulado os possíveis motivos que justifiquem a pequena variabilidade genética neste parasita. Estudos populacionais sugerem que em todos os lócus há apenas dois alelos, indicando que estas três linhagens tenham dois ancestrais comuns (denominadas "A" e "E", de Adão e Eva, respectivamente), com limitadas variações gênicas, que foram cruzados recentemente na história evolutiva. Cada lócus genético desse organismo haplóide possui um alelo derivado a partir de uma ou de outra das cepas ancestrais, os três genótipos são definidos pela mistura destes alelos (GRIGG *et al.*, 2001a). Outra análise comparativa do genoma das cepas Tipo I, II e III, mostrou que há um cromossomo idêntico – denominado cromossomo Ia (*chrIa*) – comum às três linhagens (KHAN *et al.*, 2006). Este cromossomo parece ser o único que não é susceptível a polimorfismos, dado

que corrobora a hipótese de um ancestral comum para as três linhagens distintas (BOYLE *et al.*, 2006).

O Toxoplasma não depende essencialmente da fase sexuada do seu ciclo para sua sobrevivência e disseminação, ao contrário de outras espécies do gênero Apicomplexa, tais como *plasmodium spp*. e a *Eimeria spp*, nas quais a manutenção do ciclo sexual parece ser vital para a geração da diversidade necessária à adaptação ao meio ambiente, sobrevivência no hospedeiro, transmissibilidade e virulência (revisto por KYES *et al.*, 2001). Na fase assexuada do seu ciclo (ver **Figura 1**), desde a progênie (esporozoítas) até a formação do cisto tecidual, todas as formas evolutivas são infectantes para hospedeiros intermediários (DUBEY *e* BEATTLE, 1988). Deste modo, a reprodução sexuada pode ser evitada, minimizando a possibilidade de cruzamento entre os genótipos e garantindo a transmissão da espécie com mínimo de recombinação meiótica (KHAN *et al.*, 2006). Esta característica biológica do parasita, denominada de transmissão oral assexuada, parece determinar a estrutura da população clonal com apenas três linhagens predominantes (DARDE *et al.*, 1992; SIBLEY e BOOTHROYD, 1992; HOWE e SIBLEY, 1995).

A virulência do *Toxoplasma* é normalmente definida com base na dose letal 50 (DL50) em modelos murinos, porém pouco se sabe sobre a virulência deste parasito em outras espécies. As três linhagens clonais apresentam diferentes potencias para causar doença em modelos animais

(SIBLEY e BOOTHROYD, 1992). A linhagem tipo I é altamente virulenta em camundongos, com DL de apenas um parasita viável. Em contraste, as cepas tipo II e tipo III têm a DL50 em mais que 10^3 parasitas (HOWE e SIBLEY, 1995). Visando explicar as bases das diferenças na patogenicidade entre os tipos de parasita, estudo de mapeamento genético identificou um lócus comum na cepa tipo I que pode estar associado à maior virulência desta linhagem em murinos (SU *et al.*, 2002).

Os estudos até então publicados sobre a infecção pelo *T. gondii* em humanos, atribuem à cepa tipo II como responsável (81%) pela toxoplasmose congênita e em indivíduos imunocomprometidos na América do Norte e Europa, principalmente na França (HOWE *et al.*, 1997; HONORÉ *et al.*, 2000; FUENTES *et al.*, 2001), enquanto os tipos I e III foram encontrados em 10 e 9% dos isolados de seres humanos, respectivamente (HOWE *et al.*, 1997), porém há relatos do isolamento de cepas do tipo I em casos de toxoplasmose congênita na Espanha e em Portugal (FUENTES *et al.*, 2001). Há uma tendência em associar a doença em seres humanos à linhagem tipo II, já que parasitas deste tipo constituem pelo menos dois terços dos isolados em humanos (HOWE e SIBLEY, 1995).

Diante dos estudos funcionais sobre as diferentes cepas do *T. gondii*, pode-se concluir que são linhagens e não verdadeiras espécies, já que foram identificados genótipos mistos. Todavia, o "clone" tipo é uma entidade taxonômica importante, do ponto de vista médico, pois apresenta

características biológicas diferentes (HOWE, 1995; SIBLEY, 1999). Embora muitos estudos tenham sugerido que o genótipo do parasita pode definir a apresentação clínica da toxoplasmose humana, diante da ampla disseminação deste parasita, muitas outras pesquisa ainda são necessárias em diversas populações, pois é possível que o padrão de doença seja definido não só pelo T. gondii, mas também pela relação parasito-hospedeiro e o meio-ambiente (HOWE, 1995; HOWE, 1997; SIBLEY, 1999; HOLLAND, 2004).

Algumas evidências da relação entre o genótipo do parasito e a gravidade da doença ocular têm sido apresentadas na literatura. Grigg e colaboradores (2001) mostraram que a cepa tipo I e algumas linhagens atípicas foram isoladas em indivíduos imunocompetentes com TO grave nos Estados Unidos (GRIGG *et al.*, 2001b). No caso do Brasil, a caracterização de parasitas presentes nas retinas de alguns indivíduos de São Paulo (SP) e de Erechim (RS) também sugerem a presença do Tipo I (VALLOCHI *et al.*, 2005a).

Linhagens de *T. gondii* com atípica ou nova combinação de alelos têm sido isoladas de animais não domésticos, em alguns continentes como América do Sul e África (DARDÉ *et al.*, 1998; AJZENBERG *et al.*, 2004; LEHMANN *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2004). Todavia, a grande maioria dos estudos de caracterização genotípica tem examinado apenas um (SAG2) ou dois marcadores genotípicos do parasita (FUENTES *et al.*, 2001; DUBEY *et al.*, 2004; VALLOCHI *et al.*, 2005), como muitas linhagens dividem o mesmo alelo de muitos loci, a correta caracterização genotípica da cepa deve

ser feita através da genotipagem mutilocus ou multicromossômica (KHAN *et al*., 2005).

No Brasil, estudos com amostras de animais provenientes de alguns surtos ocorridos nos Estados do Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Amazonas também detectaram predominantemente parasitas do tipo I, alguns casos do tipo III e raramente o tipo II (DUBEY *et al.*, 2002; DUBEY *et al* 2003 a; DUBEY *et al.*, 2003b; DUBEY *et al.*, 2004; DUBEY *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2006; DUBEY *et al.*, 2006; DE MOURA *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006; PENA *et al.*, 2006).

KHAN e colaboradores (2006) genotiparam amostras de pacientes provenientes de Erechim e de dois surtos de toxoplasmose que ocorreram no Paraná (Santa Vitória do Pinhal) e Santa Catarina (Agronômica) e comparou com amostras de isolados de animais provenientes de Minas Gerais e Erechim. Os dados desse trabalho mostram que os isolados de *T. gondii* da região de Erechim são genotipicamente divergentes dos padrões convencionais previamente descritos para amostras da América do Norte e Europa. De todas as amostras analisadas, animais e humanos, apenas uma apresentou genótipo do Tipo I, as demais apresentaram padrões genotípicos atípicos, que por análise foligenética, sugere o intercruzamento entre as três linhagens clonais (KHAN *et al.*, 2006).

As estratégias atuais para classificação da cepa do *T. gondii* são tipicamente focadas em estabelecer diferenças inter-cepas via proteínas

(DARDÉ, 1996) ou por classificação genômica (GRIGG e BOOTHROYD, 2001; AJZENBERG *et al.*, 2002). Para estas análises é necessário o isolamento de grande quantidade de DNA do parasita ou a infecção de outros organismos para obtenção de proteínas. Devido à dificuldade de obtenção deste tipo de material biológico, há limitações técnicas para estes estudos em grandes populações (HOLLAND, 2006).

Novas abordagens técnicas surgiram na tentativa de caracterizar as linhagens do parasita e sua importância na patogenicidade aos seres humanos. Utilizando seqüências de nucleotídeos das três linhagens, obtidas a partir do GenBank, por ESTs (*expressed sequence tags*) do Toxoplasma ou por sequenciamento direto de proteínas imunogênicas de antígenos do *T. gondii*, KONG e colaboradores (2003) descrevam peptídeos recombinantes contendo regiões polimórficas imunogênicas das linhagens tipo I, II, III. Através da utilização destes peptídeos pela técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme-Lynked Immunoabsorbant Assay*), é possível detectar no soro ou plasma anticorpos cepa-específicos e, desta forma, determinar qual a linhagem infectante em hospedeiros humanos e animais.

O desenvolvimento do método de sorotipagem de cepas baseou-se no fato de que o *T. gondii* estimula uma forte e persistente resposta humoral em todos hospedeiros. Anticorpos contra proteínas do parasita permanecem com títulos elevados por toda a vida do hospedeiro e estão presentes em pacientes com essencialmente todas as manifestações clínicas da infecção

(FRENKEL *et al.*, 1991; ASAI *et al.*, 1992). Dados na literatura mostram que a resposta imune humoral contra o *T. gondii* é cepa-específica. Para exemplificar, 5 de 5 anticorpos de monoclonais de camundongos (MAbs) para SAG2A isolados depois de uma infecção natural eram alelo-específicos (i.e., os anticorpos reconhecem o alelo expresso por tipo I e III, mas não o tipo II, embora todos os 3 tipos expressem níveis aproximadamente iguais da proteína de SAG2A) (PARMLEY *et al.*, 1994). Conseqüentemente, epitopos polimórficos parecem ser altamente imunogênicos e, possivelmente, imunodominantes (KONG *et al.*, 2003). Em humanos, a presença de anticorpos contra regiões específicas das proteínas do grânulo denso 6 (GRA6) (FAZAELI *et al.*, 2000) e 7 (GRA7) (JACOBS *et al.*, 1999) do *Toxoplasma*, pode discriminar seguramente se a infecção é por uma cepa Tipo II ou pelos Tipos I e III (KONG *et al.*, 2003).

1.4. Manifestações Clínicas da Toxoplasmose

A patogenicidade e o tropismo cerebral deste parasita no hospedeiro imunocomprometido foram referidas por Vietzke em 1968. Até a década de 80, os casos de toxoplasmose referidos na literatura eram principalmente relacionados às infecções congênitas (DESMONTS, 1966; 1975), mas a expansão das técnicas de transplante e, sobretudo o avanço da pandemia da AIDS identificaram esta parasitose como infecção emergente, sendo uma

importante causa de morbidade e mortalidade nos imunodeficientes de várias etiologias (LUFT e REMINGTON, 1992)

A infecção aguda adquirida no adulto imunocompetente é normalmente assintomática, evoluindo rapidamente para a cronicidade (DENKERS, 2003). Por outro lado, a infecção primária durante a gravidez, mesmo que assintomática ou subclínica, pode ser transmitida ao feto originando uma infecção congênita. A transmissão materno-fetal está relacionada ao aporte sangüíneo para a placenta, sendo maior nas fases tardias da gestação. A gravidade para o feto é maior quando a infecção ocorre entre a 10ª e 24ª semanas. Neste período, os danos ao feto podem ser letais, podendo resultar em aborto, ou lesões neurológicas e oftalmológicas com graves seqüelas (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000; GROSS, HOLPERT e GOEBEL, 2004) O feto acometido no último trimestre da gravidez é geralmente assintomático ou com manifestações discretas (KAPPERUD *et al*., 1996). A infecção fetal pode ser atenuada ou prevenida quando o tratamento materno é iniciado precocemente (JONES *et al.*, 2001).

Em indivíduos imunodeprimidos, a encefalite toxoplásmica (ET) é uma importante manifestação clínica (LUFT e REMINGTON, 1992; WONG e REMINGTON, 1993; WONG *e* REMINGTON, 1994). A progressão e a gravidade da doença é significativamente variável entre os casos relatados de toxoplasmose, provavelmente estas variações possam ser relacionadas às características do hospedeiro (MCLEOD *et al.*, 1989; SUZUKI *et al.*, 1996) e/ ou

variações genéticas na cepa infectante (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992; HOWE *et al.*, 1996). A ET foi considerada uma das mais comuns infecções oportunistas de pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LUFT e REMNIGTON, 1992).

A retinocoroidite toxoplásmica (TO) é definida como a uveíte posterior infecciosa mais comum, inclusive na população brasileira (HOLLAND, 2003; GARCIA *et al.*, 2003). As lesões oculares causadas pelo *T. gondii* podem ser originadas tanto da infecção congênita, quanto da infecção adquirida após o nascimento (SILVEIRA, *et al.*, 1988, GLASNER *et al.*, 1992). Na região Sul do Brasil são muitos os casos de infecção pós-natal (SILVEIRA *et al.*, 1988, 2001; HOLLAND, 2000) e nos EUA um estudo dos riscos da infecção concluiu que pelo menos dois terços dos casos de TO são causados por infecção adquirida (GILBERT e STANFORD, 2000).

A TO é caracterizada por uma lesão cicatricial atrófica, geralmente localizada na mácula. A lesão clássica inicia-se na retina neural e, após o desenvolvimento da resposta inflamatória, passa a envolver as demais camadas da retina, assim como a coróide (ROBERTS e MCLEOD, 1999). Na fase aguda, há edema de retina e a lesão tem coloração creme. A reativação da doença apresenta-se como uma retinite focal, de tamanho variável, com forma ovalada ou circular. Pontos hemorrágicos e infiltrados inflamatórios estão presentes na maioria dos casos. A presença de células inflamatórias na câmara anterior do olho também pode ser observada.

A fundoscopia ou exame de fundo de olho e a retinografia são ferramentas diagnósticas para visualização das lesões oculares, que permitem ao especialista visualizar as características da lesão e a sua gravidade. Na **Figura 3** apresentamos retinografias realizadas na Clínica Silveira em indivíduos de Erechim. Para efeito de comparação, mostramos o exame de um indivíduo saudável (**Figura 3A**). Na porção inferior da figura, apresentamos retinografias dos dois olhos de um paciente imunocompetente com toxoplasmose ocular adquirida. Uma característica da TO neste paciente é o aparecimento de regiões cicatrizadas, conseqüentes da auto-resolução do processo inflamatório local, que podem ser vistas em ambos os olhos. Quando a lesão é reativada, normalmente pode ser vista a retinite focal, de tamanho variável, a qual normalmente ocorre em apenas um olho (**Figura 3B**). Com a evolução da doença e a diminuição da resposta inflamatória, ocorre o atrofiamento da lesão e as bordas tornam-se hiperpigmentadas, provavelmente pelo dano tecidual (**Figura 3C**). SILVEIRA e colaboradores (2001) relataram que lesões típicas da TO incluem minúsculos e não-específicos focos pigmentados, que podem ser vistos em conjuntos de pequenas cicatrizes retinocoroidais em qualquer parte da retina (SILVEIRA *et al.*, 2001).

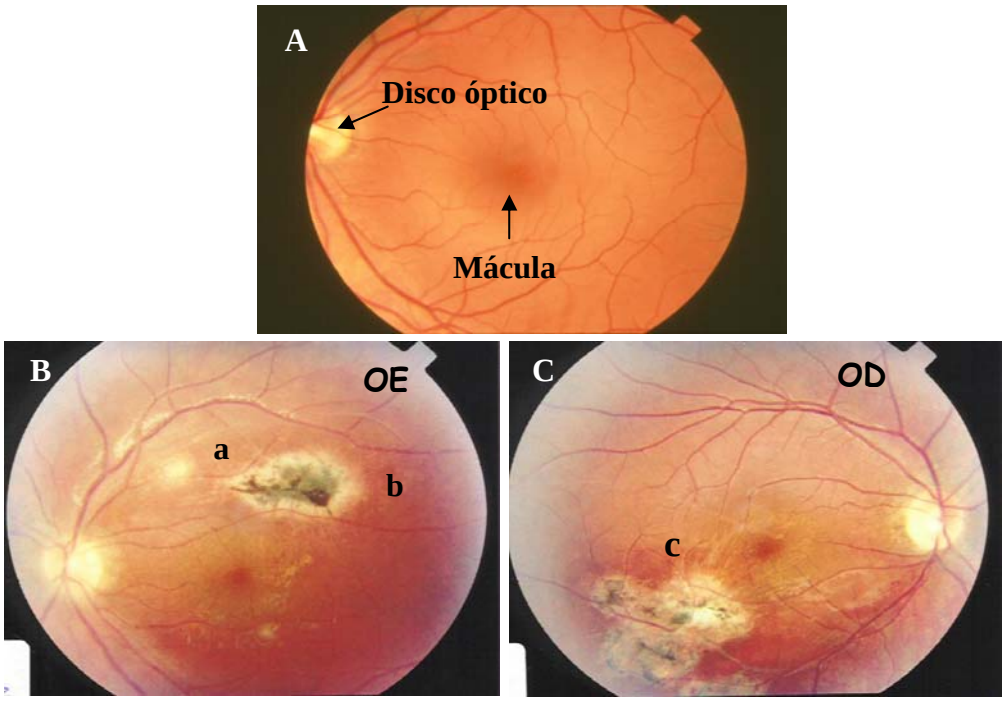


Figura 3 – Retinografias de indivíduos de Erechim. (A) Retina normal (B e C) de paciente com toxoplasmose ocular. (OE) olho esquerdo; (a) recidiva ativa; (b) lesão cicatrizando; (OD) olho direito; (c) retinocoroidite cicatrizada. (Fonte: Clínica Silveira)

As características das lesões podem variar de acordo com o estado imunológico do indivíduo. Em pacientes com AIDS, as lesões comumente descritas são múltiplas, ativas, porém pequenas e pouco espessas, envolvendo camadas internas e externas, podendo acometer ambos os olhos (HOLLAND *et al.*, 1988; HOLLAND, 1989). Em indivíduos imunocompetentes, aparece um foco com lesão ativa, mesmo que apresentem diversas áreas cicatriciais aglomeradas. As lesões tipicamente apresentam diâmetro menor que 1000μm e são encontradas no pólo posterior do olho (COCHEREAU-

MASSIN *et al.*, 1990; BEGER *et al.*, 1993; DOFT e GASS, 1985; MATHEUS e WEITTER, 1988).

Muitos trabalhos apóiam a hipótese de que a infecção pelo *T. gondii* nos estágios iniciais de desenvolvimento da retina pode favorecer o comprometimento da mácula. Diferenças anatômicas e micro vasculares entre a mácula e a região periférica da retina poderiam criar um microambiente que influência na localização da lesão (YANG *et al.*, 2000; BOSCH-DRIESSEN *et al.*, 2002;). As lesões na região da mácula são mais freqüentes em casos de toxoplasmose congênita (HORGAN *et al.*, 1964; FRIEDMANN *e* KNOX, 1969). Contudo, aproximadamente 38% dos pacientes de Erechim com evidência sorológica para infecção adquirida apresentaram lesões maculares (dado apresentado pelo Dr. Cláudio Silveira no *International Conference on Toxoplasmosis*, Copenhague, Dinamarca, 23-25 de Junho de 2003).

A susceptibilidade ao desenvolvimento da lesão ocular grave pode estar relacionada à virulência do parasita, inóculo infectante, meio-ambiente, influenciando na relação parasito-hospedeiro, e ao hospedeiro. Embora não tenha sido observada nenhuma associação entre etnias e a doença ocular, hábitos alimentares de certas populações podem aumentar a exposição ao agente infeccioso, tornando a população mais susceptível (revisado por HOLLAND, 2004; JONES *et al.*, 2006).

No que se referem às características do hospedeiro, algumas importantes associações já foram descritas: 1) Idade - na grande maioria dos trabalhos publicados há um consenso de que entre 20 e 40 anos há maior freqüência da doença ocular (FRIEDMANN e KNOW, 1969; BURNETT *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2001; BOSCH-DRIESSEN *et al.*, 2002); 2) Estado imunológico - a epidemia da AIDS mostrou que o estado de imunodeficiência torna o paciente extremamente vulnerável ao desenvolvimento de lesão grave (REHDER *et al.*, 1988; HOLLAND *et al.*, 1988, HOLLAND *et al.*, 1989; BERGER *et al.*, 1993; MOORTHY *et al.*, 1993). Em pacientes idosos o comprometimento na resposta imune inata e adaptativa induz alterações funcionais em linfócitos, células matadoras naturais (NK, do inglês "natural killer") e macrófagos (JOHNSON *et al.*, 1997); 3) Gestação – em gestantes há significativa freqüência de recorrência da retinocoroidite toxoplásmica, é possível que esta associação esteja relacionada às alterações imunológicas e hormonais oriundas da própria gestação (HOLLAND *et al.*, 1996; FRIEDMANN e KNOX, 1969; O'CONNOR, 1983; HOLLAND, 2004).

A reativação das lesões na retina na TO pode também ocorrer pela ruptura do cisto tecidual na fase crônica da infecção. Quando a supressão imune por drogas ou por outras infecções permite a reversão da forma bradizoíta para taquizoíta, reativa a replicação do parasita, estimulando o sistema imune a um intenso processo inflamatório local, que pode levar à necrose tecidual (HOLLAND *et al.*, 1988).

1.5. Resposta Imune ao T. gondii

Uma vez ingerido, pela via oral, em seu hospedeiro, o *T. gondii* invade o trato gastrintestinal, penetra na mucosa do intestino, onde vai deparar-se com a camada de células epiteliais - enterócitos. Estas células sofrem mudanças morfofisiológicas, passam a secretar moléculas citotóxicas, como o óxido nítrico e, paralelamente, secretam quimiocinas e citocinas que atraem neutrófilos, macrófagos e células dendríticas para o sítio infeccioso. Desta maneira, ainda na fase precoce da infecção, está desencadeada a resposta imune inata contra *T. gondii* (PAVLI *et al.* 1993).

Neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs) são essenciais na fase de indução da imunidade, pois são células secretoras de IL-12, uma citocina fundamental na resistência à infecção na fase aguda (DENKERS, CASPAR e SHER, 1994; DENKERS e GAZZINELLI, 1998). Através da produção de IL-12 há estimulação das células NK a produzirem IFN-γ e promover o desenvolvimento de células Th1 (do inglês, *T helper*) produtoras de IFN-γ (GAZZINELLI *et al.*, 1994).

Em modelos experimentais, *in vivo* e *in vitro*, os neutrófilos estimulados com taquizoítas migram rapidamente, entre 2-3 horas, para o sítio de inoculação do parasita e secretam IL-12 pré-armazenada. Apesar da quantidade de IL-12 liberada por célula ser pequena, é possível que devido ao grande número de células que migram para o sítio da infecção, a liberação local de citocinas tenha função biológica e protetora na infecção

recente (BLISS *et al.*, 2000). A depleção de neutrófilos torna o hospedeiro mais suscetível à infecção (BLISS *et al.*, 2001).

A ativação dos macrófagos inibe ou mata o parasita intracelular (DENKERS e GAZZINELLI, 1998; DENKERS, 2003). BUTCHER & DENKERS (2002) demonstraram que macrófagos podem induzir a imunidade adquirida através da liberação de citocinas, como IL-12, e pela apresentação de antígenos peptídicos aos linfócitos T, via o complexo de histocompatibilidade (MHC) e co-estimulação de moléculas. No entanto, o *T. gondii* inibe a produção de NO pelo macrófago infectado, através da redução da expressão de NO sintase indutível (iNOS); estimula a produção de TGF-β1 (fator transformador de crescimento- beta 1) e IL-10, diminuindo a ativação destas células e a sua atividade anti-protozoária (SEABRA, SOUZA e DAMATTA, 2002). Além disso, há diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como, IL-12 e TNF-α (fator de necrose tumoral – alfa), devido à inibição da translocação para o núcleo do fator de transcrição (NF-κB) (BUTCHER e DENKERS, 2002) e STAT 1 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription*) (LUDER *et al.*, 2001).

As DCs são uma fonte importante de secreção de IL-12 e desempenham um papel de maior relevância na imunidade celular em resposta à patógenos intracelulares (ALIBERTI *et al.*; 2000) e na resposta imune específica tipo I. A interação de antígenos do parasita via receptor de quimiocina CCR5 (do inglês, *C-C chemokine rececptor*- 5) induz a síntese de

IL-12 em DCs maduras, sendo esta uma das principais vias de indução de resistência dependente de IFNγ na infecção (ALIBERTI *et al*., 2000).

DCs imaturas são alvos preferenciais para a invasão do *T. gondii* (McKEE *et al*., 2004). Após a penetração na célula, o parasita suprime a capacidade celular de participar da resposta imune inata e induzir a resposta adaptativa. A inibição da maturação das DCs é, provavelmente, por uma via semelhante a que ocorre nos macrófagos, por inibição de NF-κB e STAT1 (LUDER *et al*., 2001; DENKERS *et al*., 2003). A inabilidade de maturação das DCs compromete a ativação de linfócitos T, sugerindo que haja comprometimento da capacidade de apresentação antigênica por estas células, facilitando a disseminação do parasita no hospedeiro (McKEE *et al.*, 2004). Por outro lado, a produção de TNF-α por neutrófilos parece ser um mecanismo fundamental para estimular a maturação das DCs e, consequentemente, o desenvolvimento da resposta imune (DENKERS *et al*., 2003).

FUX e colaboradores (2003) mostraram que em modelos murinos a susceptibilidade e resistência à infecção dependem de fatores genéticos do parasita e do hospedeiro. Neste estudo, camundongos de diferentes linhagens foram infectados com uma cepa clássica Tipo II (Me-49) e uma cepa recombinante tipo I-III (P-Br), observando que a resistência à infecção com ambas as cepas é dependente da produção de IL-12, TNF-α e IFN-γ. Por outro lado, a resistência à formação de cistos teciduais e o desenvolvimento

da ET parece estar associado ao haplótipo do MHC do hospedeiro e ao arquétipo clonal do parasita (FUX *et al*., 2003).

Estudos da infecção com alguns microorganismos mostram a correlação entre as citocinas produzidas pelos linfócitos T, especialmente o IFN-γ, e a indução da imunidade protetora contra microorganismos intracelulares, inclusive o *T. gondii* (HEINZEL *et al.*, 1989; KAUFMANN, 1993 SUBAUSTE e REMINGTON, 1993; GAZZINELLI e DENKERS, SHER, 1993). SUBAUSTE & WESSENDRAP (2000) demonstraram que a sinalização CD28-CD80/CD86 regula a produção de IFN-γ, e que a interação CD40 ligante (CD40L)-CD40 regula a secreção de IL-12 e IFN-γ, durante o contato entre células T e monócitos infectados com *T. gondii* (SUBAUSTE, DE WALL MALEFYT e FUH, 1998; SUBAUSTE *et al.*, 1999).

Os linfócitos T são os principais mediadores da imunidade adquirida, sendo o padrão Th1 elegido na resposta ao *T.gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1991; 1992). Diversos experimentos mostram que camundongos atímicos são extremamente susceptíveis às linhagens virulentas e avirulentas do parasita (LINDBERG e FRENKEL, 1977; SCHLUTER *et al.*, 1995). A resistência à infecção em camundongos é dependente tanto dos linfócitos T $CD4^+$ quanto dos T $CD8^+$. Contudo, em alguns modelos murinos, linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFN-γ são os principais efetores da imunidade *in vivo* (DENKERS *et al.*, 1993). A depleção *in vivo* dos linfócitos T $CD8^+$ converteu camundongos resistentes em susceptíveis à infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1993).

Anticorpos contra o parasita são prontamente sintetizados em resposta à infecção, tanto nos seres humanos quanto nos modelos experimentais (FRENKEL *et al.*, 1991; ASAI *et al.*, 1992). A supressão da produção de anticorpos através do tratamento com anticorpos anti-μ resultou na exacerbação da infecção, enquanto a transferência passiva de soro de camundongos cronicamente infectados para camundongos deficientes de células B controlou a infecção em 50% dos animais infectados (FRENKEL *e* TAYLOR, 1982).

Embora seja controversa a participação dos anticorpos na resistência à infecção, modelos experimentais com camundongos, ratos e cobaias têm produzido diferentes resultados a respeito do potencial protetor dos anticorpos, que pode ser devido ao basal genético dos hospedeiros e/ou do parasita. A transferência passiva do soro imune ou de anticorpos monoclonais anti- *T. gondii* não foi efetiva na proteção à infecção com cepas virulentas (FOSTER e MCCULLOCH, 1968; GIL e PRAKASH, 1970), porém foi protetora para camundongos infectados com cepas de virulência moderada (MASIHI e WERNER, 1978; JOHNSON *et al.*, 1983; SHARMA *et al.*, 1984).

Citocinas são essenciais na diferenciação das células B e na troca de isótipos de imunoglobulinas (SUZUKI e KOBAYASHI, 1983). Na presença de IL-4 e anti-CD40, células B humanas secretam IgG4 *in vitro* (GASCAN *et al.*, 1991) e na presença de IL-4 e do vírus Epstein Barr (EBV), IL-4 e anti-CD40

ou anti-CD40L estas células secretam IgA. IL-4 e IL-13 parecem estar envolvidas na troca de isótipo para IgE (JABARA *et al.*, 1990).

Embora IFN-γ estimule a troca de classe para IgG2a em camundongos, a única evidência da influência desta citocina na troca de isótipo de imunoglobulinas humanas é o aumento seletivo da expressão de mRNA da cadeia γ2 nas células B (IgM^+/IgG^-) em repouso, porém não há correlação entre a troca para IgG2 (KITANI *et al.*, 1993). Ainda que IFN-γ aumente e anti-IFN-γ iniba a expressão espontânea de IgG2 pelos PBMC *in vitro*, este efeito é abolido pela depleção de células que expressam $IgG2^+$. Isto sugere que o IFN-γ atua seletivamente nas células B, as quais já realizaram troca de classe para IgG2, não agindo como um fator responsável para esta mudança de isótipo (KOU *et al.*, 1994).

A participação das subclasses de IgG em resposta a agentes infecciosos tem sido associada à gravidade dos sintomas clínicos e a resposta inflamatória (HUSSIAN *et al.*, 1995; ASHBEE *et al.*, 1997; LAGACE *et al.*, 1995; ANDERSON e GAARSLEV, 1992). Estes isótipos exercem funções biológicas efetoras especificas. Assim, sabe-se que a IgG1 e a IgG3 atuam como opsoninas, uma vez que se ligam fortemente aos receptores Fc nos fagócitos, porém a ligação da IgG2 e IgG4 a estes receptores é fraca (ROITT, BROSTOFF e MALE, 1999).

IgG1 e a IgG3 ativam também o sistema complemento através da proteína plasmática C1 da via clássica (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003).

IgG3 constitui cerca de 4 a 8% das IgG no soro humano. Juntamente com IgG1, este é o principal isótipo envolvido na resposta a antígenos virais (STEINBERG *et al.*, 1973). Pacientes deficientes de IgG3 são mais susceptíveis às infecções recorrentes, embora muitos indivíduos não desenvolvam doença (BJORKANDER *et al.*, 1985; OXELIUS *et al* 1986; LINDE *et al.*, 1988). A razão pela qual estes indivíduos permanecem saudáveis ainda não está esclarecida. Contudo, o aumento das taxas de infecção pode ser relacionado a outras desordens da imunidade humoral, inclusive na resposta de IgG2 (LINDE *et. al*, 1996).

A presença e o perfil de subclasse de IgG intra-ocular foi verificada através de dosagens no humor vítreo e humor aquoso em indivíduos normais, sendo IgG1 predominante (WALDREP e SCHULTE, 1989). Em casos de TO a produção destas subclasses parece não se alterar, provavelmente devido à inflamação local e a quebra da barreira hemato-retiniana, a invasão de anticorpos séricos neste orgão imuno-privilegiado, iniba a síntese local dos isótipos (BLOCH-MICHEL *et al*., 1998)

A toxoplasmose ocular é caracterizada por um processo inflamatório intra-ocular, que ocorre em episódios recorrentes (NUSSENBLATT, WHITCUP e PALESTINE, 1996). Alterações imunológicas observadas na retina são devido à invasão, replicação e destruição de células da retina, conseqüentes da reativação do parasita, bem como por antígenos da retina liberados pelo dano tecidual. A resposta imune contra antígenos da retina na TO, não

protege para o desenvolvimento da lesão, mas parece minimizar o desenvolvimento de lesões graves (VALLOCHI *et al*., 2005b). Taquizoítas e cistos são encontrados no epitélio de camada única presente entre a coróide e a neuroretina (Epitélio Pigmentar da Retina – RPE) de pacientes com toxoplasmose ocular (NICHOLSON e WOLCHOK, 1976).

O RPE é secretor de citocinas como IL-6 (LYONS *et al*., 2001), IL-8 (ELNER *et al*., 1990) e NO em resposta a citocinas pró-inflamatórias e LPS. Além destas, IFN-γ (GAZZINELLI *et al*., 1994) e TGF-β (NAGINENI, DETRIC e HOOKS, 2002) também estão envolvidas na imunopatogênese da TO. A presença de mediadores inflamatórios neste tecido estimula a expressão de moléculas do MHC classe I e II e participa da apresentação antigênica intra-ocular (DETRICK *et al*., 1985). Um dos mecanismos propostos, é que produção de TGF-β pelo RPE regule negativamente a ativação de células NK em resposta a antígenos do *T. gondii e*, conseqüentemente, inibe a produção de IFN-γ (HAUSMANN *et al*., 1994). Em outra via, o TGF-β inibe a indução da enzima indolamina (IDO) nas células humanas, favorecendo a replicação do parasita e a imunopatogênese à retina (NAGINENI *et al*., 2002)

A produção intra-ocular de anticorpos ocorre em casos de TO ativa, podendo ser determinada pela detecção dos isótipos no humor aquoso e comparação com os títulos séricos. No entanto, o uso desta pesquisa só deverá ser considerada em casos de retinocoroidite ativa de etiologia

desconhecida, quando o diagnóstico clínico é pouco elucidativo (revisto por HOLLAND, 2004).

1.6. Diagnóstico da Toxoplasmose

Grande parte das infecções pelo toxoplasma são sub-clínicas e o diagnóstico é usualmente baseado no critério imunológico. Convencionalmente, os estudos se baseiam na detecção de especificas IgG, IgM (DANNEMANN *et al.*, 1990; REMINGTON e DESMONTS, 1990) e IgA, associando-os à pesquisa de avidez de IgG (BESSIERES *et al.*, 1992; DECOSTER *et al.*, 1991; PINON *et al.*, 1986; STEPICK-BIEK *et al.*, 1990). Embora seja considerado um bom marcador da fase aguda, a detecção de IgE específica raramente tem sido utilizada na rotina diagnóstica (VILLENA *et al.*, 1999).

A presença de anticorpos específicos no soro ou a presença do parasita no humor aquoso, detectada pela PCR, ainda é utilizada como a modalidade primária de diagnóstico laboratorial da TO (SANTORO *et al.*, 1985; SUZUKI *et al.*, 1990; HOLLIMAN *et al.*, 1994), entretanto não existe nenhum teste que, de forma única, suporte ou afaste o diagnóstico de infecção recente ou tardia (ROBERTS *et al.*, 2001). A definição de uma infecção aguda ou recente é também extremamente importante, nos casos de infecção em gestantes, diante dos riscos que a infecção representa para o feto, inclusive a retinocoroidite (REMINGTON e DESMONTS, 1990; HOLLAND, 1999)

Anticorpos IgM surgem a partir do 5º dia de infecção podendo diminuir em poucas semanas ou meses., podendo persistir por até 18 meses, não significando necessariamente infecção recente (HALL *et al.*, 1983). Anticorpos IgA são detectados em infecções agudas, na doença congênita e podem ser detectáveis por meses ou até mais de 1 ano. Normalmente estes anticorpos são mais sensíveis que IgM na infecção congênita (ASHBURN *et al.*, 1998, FOULON *et al.* 1999). A pesquisa de IgE também está relacionada com toxoplasmose aguda, uma vez que sua detecção é possível na fase inicial da infecção e perdura por um curto período de tempo, porém ainda não é de uso corrente na prática clínica (PINON *et al.*, 1990).

Anticorpos IgG surgem em 1 a 2 semanas, têm pico em 1 ou 2 meses e caem variavelmente, podendo persistir por toda vida. Valores elevados de IgG com IgM negativo não descartam a possibilidade de infecção recente (HAYDE *et al.*, 1995). Em pacientes com comprometimento ocular por *T. gondii* o diagnóstico sorológico disponível ainda é pouco elucidativo. Títulos baixos de IgG são freqüentes e IgM geralmente não é detectável. Assim, o diagnóstico baseia-se, na maioria das vezes, no exame oftalmológico. A PCR pode detectar o *T. gondii* no humor aquoso e vítreo (MONTOYA *et al.*, 1997), porém é uma coleta invasiva para o paciente.

Foi demonstrado que a maturação da resposta de IgG após a infecção primária, definida como a afinidade de ligação deste anticorpo ao seu antígeno específico (índice de avidez), varia consideravelmente entre

indivíduos (JENUN *et al.*, 1997). O baixo índice de avidez de IgG é detectado após os primeiros contatos com o antígeno, consecutivamente, após algumas semanas, há o aumento da afinidade, através da seleção clonal de células B. A proporção de alta avidez aumenta progressivamente depois de uma imunização primária, embora a baixa avidez de IgG possa persistir por longo período (LAPPALAINEN e HEDMAN, 2004).

Durante a gestação, a detecção de alta avidez no soro materno no primeiro trimestre, é um forte indicador contra infecção materna primária. Todavia, ainda que seja sugestivo de baixo risco de transmissão para o feto (LAPPALAINEN e HEDMAN, 2004; REMINGTON, THULLIEZ e MONTOYA, 2004), o monitoramento da infecção deve ser continuado, pois pode ocorrer a toxoplasmose congênita (SILVEIRA *et. al*, 2003).

1.7. Tratamento da Toxoplasmose

A profilaxia e tratamento da toxoplasmose ocular são usualmente feitos pela combinação de duas drogas - sulfadiazina e pirimetamina (HOLLAND *e* LEWIS, 2002), que agem promovendo o efeito sinérgico do bloqueio da via de biosíntese do folato através da inibição da dihidropteroato sintetase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR), respectivamente (WONG e REMINGTON, 1993; STRAY-PEDERSON, 1992). Cofatores de folato reduzido são essenciais para diversos processos bioquímicos, incluindo a formação de DNA. O *T. gondii*, como muitos microrganismos, sintetiza folatos *de novo*,

pois se imagina que sejam incapazes de usar folatos pré-formados presentes na dieta. As enzimas desta via são, portanto, bons alvos para a quimioterapia anti-microbiana.

O tratamento no recém-nascido e em crianças de até um ano de idade (infecção congênita) é também realizado com agentes anti-folato, pirimetamina e sulfadiazina, mesmo sem manifestações clínicas. Ácido fólico associado à pirimetamina também é utilizado para reduzir a toxicidade à medula óssea. Infecção ocular ativa é tratada com as mesmas medicações até a cicatrização das lesões. Outras drogas, como atovaquona e antibióticos macrolídeos (clindamicina) são usados para tratar a toxoplasmose em casos de tolerância à sulfadiazina. Corticosteróides orais são administrados quando a mácula e disco ótico são afetados, havendo riscos à visão pela inflamação. Entretanto, há poucos dados demonstrando a eficácia do uso de corticosteróides. A imunossupressão pode potencializar a divisão do *T.gondii* e exacerbar as lesões oculares (SILVEIRA, 2002; ROBERTS e MCLEOD, 1999).

Tratamentos prolongados com sulfametoxazol e trimetoprim retardam ou reduzem as freqüências das recidivas (SILVEIRA *et al.*, 2002). Esta terapia não deve eliminar os cistos do olho, porém pode suprimir a proliferação ocasional dos taquizoítas, permitindo o estabelecimento das defesas efetivas do hospedeiro, antes da ocorrência de lesões clinicamente importantes.

Diversos estudos têm sido realizados sobre a imunidade celular, contribuindo para o entendimento da imunopatogênese da toxoplasmose,

porém, este conhecimento ainda não é utilizado para manejo clínico da doença. Em contraste, pouco conhecimento se detém sobre a resposta imune humoral, que é uma importante ferramenta diagnóstica. Abordagens mais aprofundadas sobre a participação dos anticorpos no curso da infecção, persistência da produção de determinados isótipos e especificidade da resposta humoral frente a diferentes cepas do parasita, ainda são necessárias. Buscando melhor entender a dinâmica da infecção, nós hipotetizamos que diferenças na produção sistêmica dos isótipos poderiam refletir variabilidades inter-indivíduos associadas à proteção ou gravidade da toxoplasmose ocular.

Em nosso estudo longitudinal que mostramos a associação entre a cepa do parasita, a resposta imune humoral dos pacientes e as diferentes manifestações clínicas da toxoplasmose ocular. Avaliamos aspectos fundamentais para o entendimento da relação parasito-hospedeiro em uma população de valiosa importância epidemiológica, na qual a incidência da doença ocular é uma das maiores do mundo.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi investigar aspectos do parasita e do hospedeiro associados à gravidade da toxoplasmose ocular. Para isso, caracterizamos a reposta imune humoral e a resposta aos peptídeos cepa-específicos, em amostras de pacientes com toxoplasmose adquirida em diversas fases da infecção e com diferentes formas clínicas da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foi avaliado em um estudo longitudinal o total de 322 (trezentos e vinte e dois) indivíduos, provenientes da Clínica Silveira, região de Erechim – Rio Grande do Sul e de surtos de toxoplasmose no Sul do Brasil, dos quais, 05 (cinco) pacientes vieram da cidade de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul e 05 (cinco) do município de Agronômica, em Santa Catarina. Todos foram avaliados clinicamente pela equipe da Clínica Silveira. O número de pacientes incluídos em cada metodologia utilizada neste estudo foi variável e será especificado na sessão de resultados. Dentre os pacientes analisados: 166 apresentavam lesão ocular, 106 indivíduos eram soropositivos para *T. gondii* e sem lesão ocular e 40 indivíduos saudáveis, com sorologia negativa para Toxoplasma. Amostras de 20 pacientes foram coletadas em diferentes tempos para o acompanhamento da evolução sorológica da infecção. Todos os pacientes avaliados passaram por uma triagem sorológica para IgG e IgM anti- *T. gondii,* no Laboratório Fleury – São Paulo. Os voluntários avaliados tinham idade entre 01 e 60 anos, de ambos os sexos. Em relação à etnia, todos os voluntários são descendentes de caucasianos europeus, principalmente poloneses e italianos. Os grupos analisados estão sumarizados na **Tabela1**.

Os protocolos descritos foram previamente aprovados pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, concordando com a participação no estudo (**Anexo A**).

O diagnóstico clínico da TO foi feito pelo Dr. Cláudio Silveira utilizando critérios previamente descritos (SILVEIRA *et al.,* 1988; SILVEIRA *et al.,* 2001). Resumidamente, o diagnóstico da infecção foi feito baseado na história e no exame clínico do paciente, retinografia e perfil sorológico (Laboratório Fleury – São Paulo – SP). As lesões brandas foram definidas como: lesões superficiais, pequenas, com menos de 1/4 do tamanho do disco óptico; com pouco ou rara inflamação intra-ocular, localizadas em regiões da retina sem o comprometimento da mácula e/ou do disco óptico. As lesões graves foram assim definidas: baixa da acuidade visual do paciente, lesões localizadas próximas da mácula ou disco óptico, presença de processos inflamatórios (retinite, vasculite, papilite, vitreíte, edema de mácula e disco óptico), tamanho equivalente a metade ou mais do disco óptico, bordas bem definidas, pigmentadas e profundas, em alguns casos, atingindo a coróide. Foram critérios de exclusão sorologia positiva para sífilis, HIV e tuberculose.

De acordo com estes critérios foram estabelecidos seis grupos de estudo, sendo:

- **Grupo Soronegativo**: 40 indivíduos IgM-/IgG- para *T. gondii*;

- **Grupo Soropositivo sem lesão ocular (TO)**: 50 indivíduos com infecção crônica (IgM-/IgG+ anti- *T. gondii)* há mais de 05 anos, sem lesão ocular ou qualquer outra manifestação de toxoplasmose;
- **Grupo IgM$^+$ sem TO**: 56 indivíduos com toxoplasmose adquirida apresentando sorologia positiva para IgM/IgG anti- *T. gondii, mas* sem lesão ocular;
- **Grupo IgM$^+$ com TO**: 20 indivíduos com toxoplasmose adquirida apresentando IgM+/IgG+ anti- *T. gondii* e com lesão ocular em estágios precoces, sem definição de gravidade;
- **Grupo TO branda**: 27 indivíduos com infecção crônica (IgM$^-$/IgG+ anti- *T. gondii*) e com lesão ocular branda;
- **Grupo TO grave** - 119 indivíduos com infecção crônica e com lesão grave.

Os pacientes cujos soros foram reativos para IgM anti- *T. gondii* no início deste estudo, ou seja, pacientes com confirmação sorológica para a toxoplasmose adquirida, foram seguidos clinicamente pela equipe médica da Clínica Silveira, para avaliação da evolução da toxoplasmose e medidas terapêuticas apropriadas. Os resultados deste seguimento e um sumário com os resultados obtidos neste estudo estão descritos no **Anexo B**.

Tabela 1. Distribuição por grupos clínicos dos indivíduos de Erechim- RS avaliados neste estudo.

Grupo	Descrição	n	Idade (anos)	Sexo		Sorologia (*anti-T. gondii*)	
				Masculino	Feminino	IgG	IgM
1	Soronegativo	40	30 (21-51)	20	20	NEG	NEG
2	Soropositivo sem TO	50	28 (7-60)	13	38	POS	NEG
3	IgM^+ sem TO	56	34 (10-51)	27	28	POS	POS
4	IgM^+ com TO	20	28 (5-58)	10	10	POS	POS
5	TO branda	28	30 (17-55)	18	10	POS	NEG
6	TO grave	119	29 (4-68)	69	49	POS	NEG
Total		**313**	24 (4-68)	157	155		

Abreviações: TO, toxoplasmose ocular; POS, positivo; NEG, negativo; n, número de indivíduos. A idade está representada pela mediana, valor mínimo e valor máximo em cada grupo.

Camundongos

Para o estudo de sorotipagem de cepas do *T. gondii* utilizamos 20 camundongos *Swiss* provenientes do biotério do Vancouver General Hospital da University of British Columbia – Vancouver – Canadá. Os camundongos foram oralmente infectados com aproximadamente10 cistos a partir das seguintes cepas do *T. gondii:* Tipo I – CAST; Tipo II - Me49; Tipo III - C56 e VEG.

Devido ao fato da cepa RH (tipo I) não evoluir à forma de cisto rapidamente, os camundongos infectados com esta cepa receberam 100 taquizoítas intra-peritonealmente. Os camundongos inoculados com RH, CAST, C57 ou VEG foram submetidos à dose de 200mg/kg de sulfadiazina

adicionados na água dos animais no terceiro ou quarto dia, permanecendo até o décimo dia após a inoculação. Este tratamento foi instituído para prevenir a morte durante a fase aguda da infecção. A coleta de sangue dos animais foi feita entre quatro e oito semanas após a infecção. Foram utilizadas amostras de 3 camundongos não infectados, como controle negativo nos testes de ELISA, para sorotipagem das cepas.

3.2. Reagentes e antígenos

3.2.1. *Antígenos do Toxoplasma gondii*

Taquizoítas da cepa RH foram utilizados como fonte de antígenos solúveis. Os parasitas foram mantidos em cultura de LLC-MK_2 (American Type Culture Collection ATCC CCL7.1) a 37°C. Para a preparação dos antígenos solúveis, os parasitas foram recuperados das culturas e passados várias vezes por uma seringa com agulha gauge 27. Os taquizoítas foram separados das eventuais células LLC-MK2 em suspensão por centrifugação de baixa velocidade (70g por 5 minutos) e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 590g por 10 minutos. Os parasitas no precipitado foram lisados por ciclos de congelamento e de descongelamento (-196°C e 37°C, respectivamente). A lise foi completada após 4 ciclos de ultra-som usando uma micro-sonda (MicrosonTM, Misonix Inc., Farmingdale, NY, EUA). O homogenato resultante foi centrifugado a 10.000g por 5 minutos. O sobrenadante obtido contém as proteínas solúveis do parasita e é

denominado STAg (Soluble *Toxoplasma* Antigen – antígenos solúveis de *Toxoplasma*). A concentração protéica foi determinada pelo kit da Pierce (Rockford, IL, USA) utilizando albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemicals Company, St. Louis, MO, EUA) como padrão. As amostras foram filtradas usando microfiltros de 0,22µm (Millipore), aliquotadas e acondicionadas a –80°C até o uso.

3.2.2. *Reagentes*

Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-IgA anti-IgE humanas e anticorpos monoclonais biotinilados anti-IgG, -IgG1, -IgG2, -IgG3 e -IgG4 humana (Pharmingen, San Diego, CA, EUA), estreptovidina HRP (Pharmingen), o substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB, Pharmingen), PBS 0,01M pH 7,2, Tween 20 (polietileno 20 surbital monolauril, Research Organics, Cleveland, Ohio, USA), tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,5M, pH 9,6 (Synth, São Paulo, Brasil), H_3PO_4 1M (Synth), kits IgM (Toxonostika IgM II, Biomérieux, França) e IgG (ETI-TOXOK-G PLUS, Dia Sorin, Itália).

3.3. Separação do plasma e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Foram coletadas amostras de sangue venoso, em tubos vacuntainer, contendo ácido cítrico 0,105M (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). A

partir destas amostras, foi realizada a centrifugação (500 g/ 5 minutos) para separação de plasma que foi aliquotado e congelado (-20º C) até o uso. PBMCs foram separadas por gradiente de densidade em solução de Isolymph (Gallard-Schleisinger Industries - Carle Place, NY, EUA). Após a separação, as células foram lavadas 3 vezes em meio de cultura suplementado e preservadas para extração de DNA genômico.

3.4. Ensaios Imunoenzimáticos para pesquisa dos isótipos

A detecção das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-*T. gondii* foi realizada pelo método de ELISA indireto. Placas de 96 poços, de fundo chato e alta afinidade (Costar, Cambridge, MA, EUA) foram sensibilizadas com 10μg/ml de STAg, em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,5M, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4ºC. As placas então foram lavadas 5 vezes com Solução de Lavagem [PBS-Tween: PBS 0,01M , pH 7,2, 0,05% Tween 20 (polietileno 20 surbital monolauril)] e submetidas ao bloqueio de regiões nos poços não cobertos pelo STAg com 200μl de PBS-Tween + 3% gelatina (Synth, São Paulo, Brasil) por poço e incubação, por três horas em estufa seca a 37ºC. As placas foram então lavadas com PBS-Tween e as amostras diluídas foram adicionadas em duplicata. A diluição dos plasmas foi em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,5M, pH 9,6, sendo IgG1 e IgG2 na razão de 1:50 e IgG3 e IgG4 na razão 1:25. Após incubação de duas horas em estufa seca a 37ºC, as placas foram novamente lavadas

com PBS-Tween e 200μl do anticorpo de detecção biotinilado (anti- IgG1, anti- IgG2, anti- IgG3, e anti- IgG4) foram adicionados na concentração de 5μg/ml. As placas foram incubadas em estufa seca a 37ºC por uma hora, novamente lavadas com PBS-Tween 0.05% e adicionados 200μl da estreptovidina HRP (*horseradish peroxidase*; Pharmingen, San Diego, EUA) diluída em 1:4000 em PBS-Tween. Após incubação de uma hora à temperatura ambiente (TA), as placas foram lavadas e 100μl do substrato - 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB, Pharmingen) foram adicionados por poço. Em seguida, as placas foram mantidas ao abrigo da luz por 5 minutos e a reação interrompida com a adição de 50μl de H_3PO_4 (1M). A leitura das absorbâncias, a 450nm, foi obtida com leitor de ELISA SpectraMax 190 da Molecular Devices (Mountain View, CA, EUA) utilizando o programa SOFTMaxPro 5.1.

A detecção de IgA e IgE específico para *T. gondii* nas amostras dos voluntários foi realizada pelo método de ELISA de captura. Placas de 96 poços de fundo chato e alta afinidade (Costar) foram sensibilizadas com 10μg/ml de anti-IgA ou IgE humana diluída em PBS-Tween e incubadas a 4ºC por 18 horas. As placas foram então lavadas 5 vezes com PBS-Tween e bloqueadas com 200μl de gelatina 3% (PBS-Tween). As placas foram incubadas em estufa seca a 37ºC por três horas e, então, novamente lavadas 5 vezes com PBS-Tween. Em seguida, foram adicionados 200μl das duplicatas das amostras, diluídas na razão 1:25 em PBS-Tween, e incubadas

em estufa seca a 37ºC por duas horas. As placas foram lavadas (5 vezes com PBS-Tween) e adicionado 100µl do conjugado composto por antígeno de *Toxoplasma* e anti-*Toxoplasma* de ovelha marcado com HRP (Biomérieux, França). Após incubação em estufa seca por uma hora, as placas foram lavadas e foi adicionado o substrato TMB. As placas foram mantidas ao abrigo da luz e, após 15 minutos da adição do substrato, a reação foi interrompida adicionando-se 50µl de H_3PO_4 1M. A leitura das absorbâncias, a 450nm, foi obtida com leitor de ELISA SpectraMax 190 da Molecular Devices (Mountain View, CA, EUA) utilizando o programa SOFTMaxPro 5.1.

Os resultados foram definidos pelo valor de corte (cut-off), que foi estabelecido como a média dos controles negativos adicionados 2 vezes o desvio padrão. Em seguida estabelecido o Índice, obtido pela divisão do valor da absorbância de cada amostra pelo cut-off. Os Índices superiores a 1,11 foram considerados positivos, entre 0,91 e 1,10 foram considerados indeterminados e inferiores a 0.90 foram considerados negativos (**ANEXO C**).

Para a determinação de anticorpos da classe IgM anti-*T. gondii* em plasma dos voluntários, foi utilizado um kit comercial de ELISA, de captura (Biomérieux, França). Amostras em duplicatas diluídas (1:100) em PBS 0,01M foram adicionadas. Os controles (negativo, positivo e fortemente positivo) foram diluídos em tampão fosfato 1:10 e também adicionados em duplicata. Em seguida, as tiras foram incubadas a 37ºC durante 1 hora,

seguido da lavagem (4 vezes) com tampão fosfato. A solução antífen (antígeno de *Toxoplasma* e anti-*Toxoplasma* de ovelha marcado com HRP) foi adicionada em cada poço e então as tiras foram incubadas a 37ºC por 1 hora. Em seguida, as tiras foram lavadas 4 vezes com PBS 0,01M e foi adicionado substrato TMB (200μl). Após incubação a TA por 30 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M. A leitura das absorbâncias, a 450nm, foi obtida com leitor de ELISA SpectraMax 190 da Molecular Devices (Mountain View, CA, EUA) utilizando o programa SOFTMaxPro 5.1.

A detecção de IgG específica para *T. gondii,* em plasma de voluntários foi obtida utilizando-se um kit comercial baseada no princípio do ELISA indireto (DiaSorin, Itália). Às tiras de microelisa, cada uma com oito poços recobertos com *Toxoplasma gondii* inativado (cepa RH), foram adicionadas duplicatas das amostras diluídas (1:100) em solução tampão, com albumina bovina sérica (BSA) Controles positivos e negativos (100μl de cada) foram utilizados. Em seguida, as tiras foram incubadas a 37ºC durante 1 hora, e imediatamente após a incubação, foram lavadas 4 vezes com PBS-Tween. Foi adicionada 100μL do conjugado enzimático (solução de IgG monoclonal de camundongo anti-IgG humana conjugada com HRP) por poço e incubados a 37ºC por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-Tween e o substrato (TMB) foi adicionado. Após incubação a TA por 30 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M. A leitura das absorbâncias, a 450nm, foi obtida com leitor de ELISA SpectraMax 190 da

Molecular Devices (Mountain View, CA, EUA) utilizando o programa SOFTMaxPro 5.1. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas, valores de densidade óptica variando em mais de 15% para uma mesma amostra foram descartados.

3.5. Definição do índice de avidez para IgG anti- T. gondii

A determinação da avidez dos anticorpos IgG específicos para o *T. gondii* foi realizada com kits comerciais Vidas Toxo IgG Avidy (BioMérieux – França) no equipamento Mini-Vidas (BioMérieux – França) em colaboração com o Laboratório Clínicos Associados – São Paulo – SP. O princípio associa o método ELISA sanduíche, em duas etapas, com uma detecção final em fluorescência (ELFA).

O cone de utilização única serve tanto para a fase sólida, como de suporte de pipetagem. Os outros reagentes estão prontos para uso e repartidos numa barrete/tira. Todas as etapas do teste foram realizadas automaticamente no equipamento. O Vidas Toxo IgG Avidy utiliza uma barrete dupla, composta por uma barrete de referência, a lavagem permite eliminar anticorpos não específicos. 100 μL da amostra, previamente diluída (soro humano + albumina+ azida sódica 1 g/l), foi colocada em cada poço das duas barretes. As IgG anti–toxoplásmicas da amostra formam complexos com o antígeno, fixado à fase sólida. Na barrete de referência, a lavagem permite eliminar os anticorpos inespecíficos. Na barrete teste, a lavagem

com o agente dissociante modifica as ligações antígeno-anticorpo. Somente os anticorpos de alta avidez permanecem ligados na fase sólida, enquanto os de baixa avidez são eliminados. Os anticorpos anti- IgG humanos conjugados com fosfatase alcalina foram aspirados e dispensados várias vezes no interior do cone, fixando-se assim às IgG humanas, eventualmente, presentes na parede do cone. Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-Metil-Umbeliferil Fosfato) é aspirado e dispensado pelo cone. A enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto (4-Metil-Umbeliferona) cuja fluorescência é medido a 450nm. Esta é proporcional à concentração dos anticorpos presente na amostra. A relação entre a quantidade de anticorpos de alta avidez (barrete teste) e a quantidade de anticorpos totais (barrete referência) fornece um índice que demonstra a avidez dos anticorpos presentes na amostra analisada. O índice superior a 31% é considerado de alta avidez, índices iguais ou entre 31% e 29% são considerados indeterminados e índices menores que 29% foram considerados de baixa avidez.

3.6. Análise sorotípica de cepas de *T. gondii*

3.6.1. *Seqüência de peptídeos*

Os peptídeos selecionados foram obtidos e utilizados no Laboratório de Biologia Molecular do Dr. Michael Grigg da British Columbia University – Vancouver – Canadá. As seqüências de nucleotídeos foram selecionadas dos

arquétipos das cepas tipo I (RH), tipo II (Me49 e Prugniaud) e tipo III (VEG e CEP) descritas no *GenBank* de seqüências expressadas pelo *Toxoplasma* ou por sequenciamento direto dos 14 imunógenos do *Toxoplasma, que são:* proteínas do grânulo denso GRA1 (BEGHETTO *et al.,* 2001), GRA3 (ROBBEN *et al.,* 2002), GRA4 (MEVELC *et al.,* 1998), GRA6 (FAZAELI *et al.,* 2000), GRA7 (JACOB *et al.,* 1999); NTPase I e III (BERMUDES *et al.,* 1994; JOHNSON *et al.,* 1999); antígenos de superfície (SAG)-1, SAG2, SAG3, SAG4, BSR4 e SRS2 (HOWE *et al.,*1997; GRIGG *et al.,* 2001; GRIGG, BOOTHROYD, 2001); e as proteínas da róptria ROP1 (KONG *et al.,* 2003). Todas as seqüências de peptídeos já foram previamente descritas (KONG *et al.,* 2003). Dois peptídeos, ctrl-1 (CEVVHDYRLFNP) e ctrl-2 (CENFSPHFVGLD), foram usados como controles negativos.

Os peptídeos foram produzidos pelo método de fase-sólida com um sintetizador automático de peptídeos e a pureza foi avaliada por espectroscopia de massa na Stanford Protein e Nucleotide facility (Stanford, CA). Um resíduo de cisteína foi adicionado na região C ou N terminal de cada peptídeo para facilitar o acoplamento à proteína carreadora “keyhole limpet hemocyanin” (KLH; Pierce by maleimide chemistry), de acordo com as especificações do fabricante. As seqüências dos peptídeos utilizados neste estudo estão descritas no **QUADRO I**.

QUADRO I. Peptídeos alelo- específicos, derivados de imunógenos do *Toxoplasma*, os quais são fortemente reconhecidos por anticorpos alelos-específicos em soros de animais ou humanos infectados pelo *Toxoplasma gondii.*

Lócus genético	***Nome***	***Seqüência dos peptídeos***
GRA6-I / III 220	6-I/III	**CLHPERVNVFDY**
dGRA6-I / III 220	d6I/III	**CLHPERVNVFD**
GRA6-II 214	6-II	**CLHPGSVNEFDF**
dGRA6-II 214	d6-II	**CLHPGSVNEFD**
GRA7-II 225	**7-II**	**CVPESGKDGEDARQ**

Nota: "I," "II," e "III" referem-se ao arquétipo da cepa que inclui a seqüência de peptídeo, os números seguintes indicam a posição na seqüência código do primeiro aminoácido de cada peptídeo. A cisteína (C) nas regiões amino (N) e carboxi (C) terminais eram acrescentadas para estabilizar o peptídeo e não estão presentes na proteína. As letras em negrito indicam os sítios polimórficos.

3.6.2. Ensaios imunoenzimáticos cepa-específicos

Peptídeos ligados a KLH foram diluídos para 10 µg/mL em 0,1M de tampão carbonato (pH 8,5). Como controle positivo para cada amostra de soro, 1% Nonidet P-40 (Calbiochem; NP-40), lisado de *Toxoplasma* – STAg - foram preparados e diluídos para o equivalente de 1000 parasitas. 50µL de cada peptídeo ou do lisado (i.e., ~50 parasitas) foi adicionado em cada poço da placa de poliestireno de ELISA (Falcon flat-bottom - Becton Dickinson – Le Pont de Claix - França) para sensibilização a 4°C por 12 horas. Cada poço foi então bloqueado com 200 µL de solução de caseína 2% (purificada de leite bovino - Sigma) em PBS com 0,01% timerosol e incubado a TA por 2 horas. Na etapa seguinte, 50µL de soro infectado diluído 1:100 em solução de caseína 1% foi adicionado em cada poço, as placas foram incubadas a TA por 3 horas. Após o período de incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com

solução de caseína 1% e então, adicionado 50 µL do anticorpo monoclonal anti- IgG humana (1:1000) ou camundongo (1:3000) conjugado com HRP (horseradish peroxidase) (BD Pharmigen). Os anticorpos conjugados foram diluídos em solução de caseína 1% e 0,1% de Tween 20. As placas foram incubadas durante 2 horas à TA. As placas foram novamente lavadas (PBS e 0,1% Tween 20) por 5 vezes e em seguida, foi adicionado 150µL do cromógeno ABTS (Kirkegaard e Perry Laboratories – Maryland - EUA), incubado por 15 minutos. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 405nm, nos tempos 15, 60, 120, 240 minutos e em 24 horas. no leitor de ELISA SpectraMax 190 da Molecular Devices (Mountain View, CA, EUA) utilizando o programa SOFTMaxPro 5.1. Amostras de soro de pacientes não-infectados serviram como controles negativos, para estabelecer a reatividade basal do ELISA e os resultados estão descritos no **Anexo D**.

3.6.3. *Normalização dos resultados dos ELISAs*

Todas as amostras foram analisadas em triplicatas, em experimentos independentes. Para cada experimento as absorbâncias (D.O.) de cada amostra eram normalizadas utilizando como referência a média aritmética das D.O. de cada amostra em relação as D.O. dos peptídeos controles (P/E e Ctrl2). Os valores de densidade ótica para cada amostra foram então normalizados com a seguinte fórmula:

$$\text{D.O. normalizada} = \frac{\text{D.O. (amostra)}}{X} \Longrightarrow \text{Onde } X = \frac{\text{D.O. P/E} + \text{D.O. ctrl.}}{2}$$

Os resultados apresentados neste trabalho representam a média de três experimentos da densidade óptica normalizada detectado para cada amostra, com leituras no tempo de 24 horas.

3.7. Análise Estatística

Foram determinados parâmetros estatísticos (média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo) dos índices de IgM, IgA e IgE e dos valores de densidade ótica de IgG total e dos subtipos de IgG utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.00 (GraphPad Software, Incorporated), para e definição dos valores de corte dos isótipos. Uma vez definido o *cut-off*, utilizamos a análise da área sobre a curva ROC (do inglês, *receiver operating characteristics*) (HANLEY e McNEIL, 1984; GREINER *et al.,* 1995) para a definição da sensibilidade, especificidade para cada isótipo. A descrição destas análises encontra-se no **Anexo E**.

As variáveis categorizadas foram representadas em gráficos por índice ou densidade ótica, onde os grupos controles e experimentais foram comparados pelos testes ANOVA e o teste de múltiplas comparações de Tukey e teste T, para dados não pareados e não-paramétricos, utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.00. O intervalo de confiança adotado foi de 95%, onde os valores descritivos (*p*) inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

4. Resultados

4.1. Avaliação da imunidade humoral na toxoplasmose ocular

4.1.1. *Características da população estudada em relação à faixa etária e sexo*

Inicialmente analisamos a correlação entre toxoplasmose ocular, idade, e sexo na população estudada, para investigar se haveria alguma correlação entre à faixa etária e o gênero com o desenvolvimento da TO. Representamos na **Figura 4**, a distribuição da população em relação à faixa etária e a presença ou ausência da lesão ocular. Os dados representam indivíduos sem lesão ocular (n=110) e com lesão ocular (n= 167). O número de indivíduos avaliados em cada grupo, por faixa etária, encontra-se descrito na tabela sob a figura.

Baseados na análise da **Figura 4**, algumas observações devem ser ressaltadas:

a) o percentual de indivíduos com lesão ocular é crescente com a faixa etária, sugerindo que a ocorrência da TO aumenta da idade;

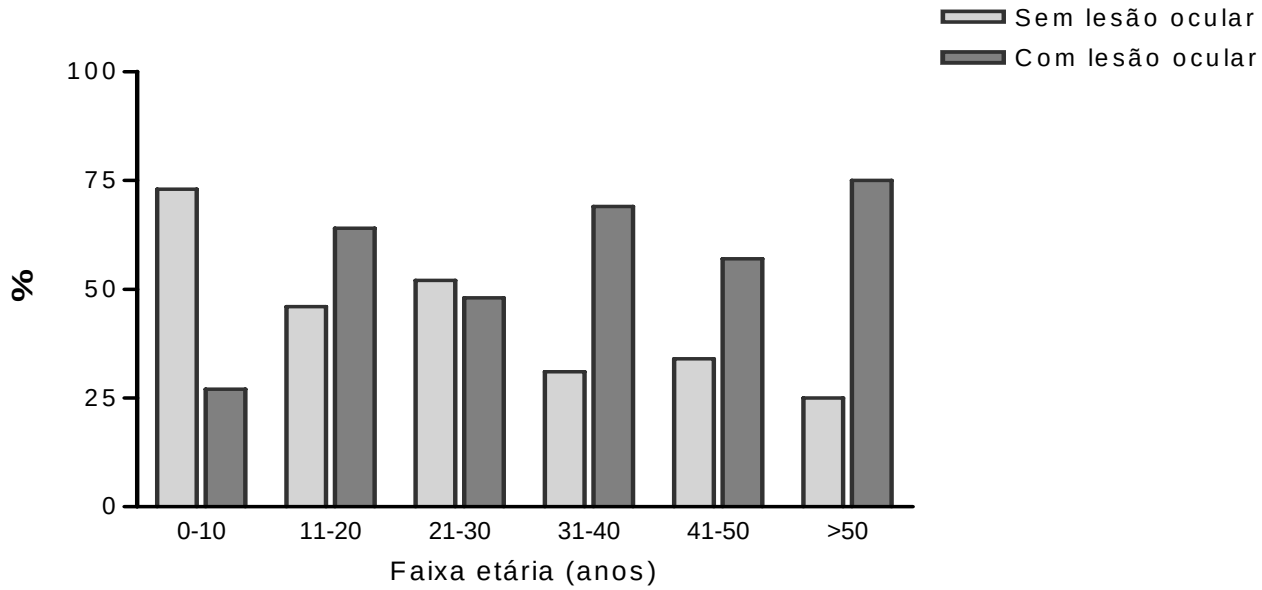
b) indivíduos soropositivos sem lesão ocular estão predominantemente na faixa de 21 a 30 anos;

c) a toxoplasmose ocular foi detectada em 69% dos indivíduos da faixa de 31 a 40 anos;

d) entre os indivíduos acima de 51 anos, a freqüência da TO parece ser alta, ainda que o número de indivíduos avaliados neste grupo foi pequeno;

e) em relação à faixa de 0 a 10 anos, embora o número de indivíduos esteja no mesmo patamar que o item anterior, parece que a freqüência da lesão ocular é baixa nesta faixa etária.

Diante do dado que a freqüência da TO aumenta com a faixa etária, podemos dizer que na população estudada, a forma adquirida é prevalente que a forma congênita, uma vez que indivíduos com TO congênita desenvolvem a lesão nos primeiros anos de vida (HOLLAND, 2004).



Grupos Clínicos \ Faixa etária (anos)	0 a 10	11 a 20	21 a 30	31 a 40	41 a 50	>50
Soropositivo sem lesão	5	11	17	9	9	3
IgM⁺ sem lesão	4	17	14	13	8	2
IgM⁺ com lesão	**1**	**2**	**1**	**6**	**6**	**2**
Lesão Branda		**6**	**11**	**17**	**5**	**1**
Lesão grave	**3**	**40**	**23**	**39**	**32**	**16**

Figura 4 – Distribuição da população estudada de acordo com a faixa etária e a toxoplasmose ocular. Gráfico representa o percentual de indivíduos classificados pela presença ou ausência da TO, em relação à faixa etária. A tabela representa o número absoluto destes indivíduos em cada grupo clínico por faixa etária, que está representada em anos.

Uma vez caracterizada a população em relação à faixa etária, verificamos também se havia diferença entre freqüência da toxoplasmose ocular e o sexo. Avaliamos 372 indivíduos, sendo: 135 do sexo feminino e 137 do sexo masculino.

Conforme apresentamos na **Figura 5A**, há maior percentagem de indivíduos do sexo masculino com lesão ocular, totalizando 58% (97/166), e maior percentagem de indivíduos do sexo feminino sem lesão ocular (66% - 66/106). Com base nesta observação, verificamos se havia diferença na distribuição por sexo e faixa etária.

Os dados representados na **Figura 5B**, mostram que há maior número de indivíduos do sexo masculino entre crianças (0-10 anos) e adolescentes (11-20 anos), enquanto, a grande maioria (60%) das mulheres soropositivas está acima dos 21 anos.

Ainda em relação ao sexo, verificamos se havia alguma diferença entre a produção dos isótipos nestes grupos. A produção de subclasses de IgG é semelhante em ambos os grupos, porém foi detectada a produção significativamente maior de IgA e IgE ($p < 0,001$), entre os indivíduos do sexo masculino, como dispõem os dados na **Figura 5C**. Além disso, verificamos que 78% dos pacientes com baixo índice de avidez eram do sexo masculino (dado não mostrado). Estes dados sugerem que há maior incidência da infecção entre homens.

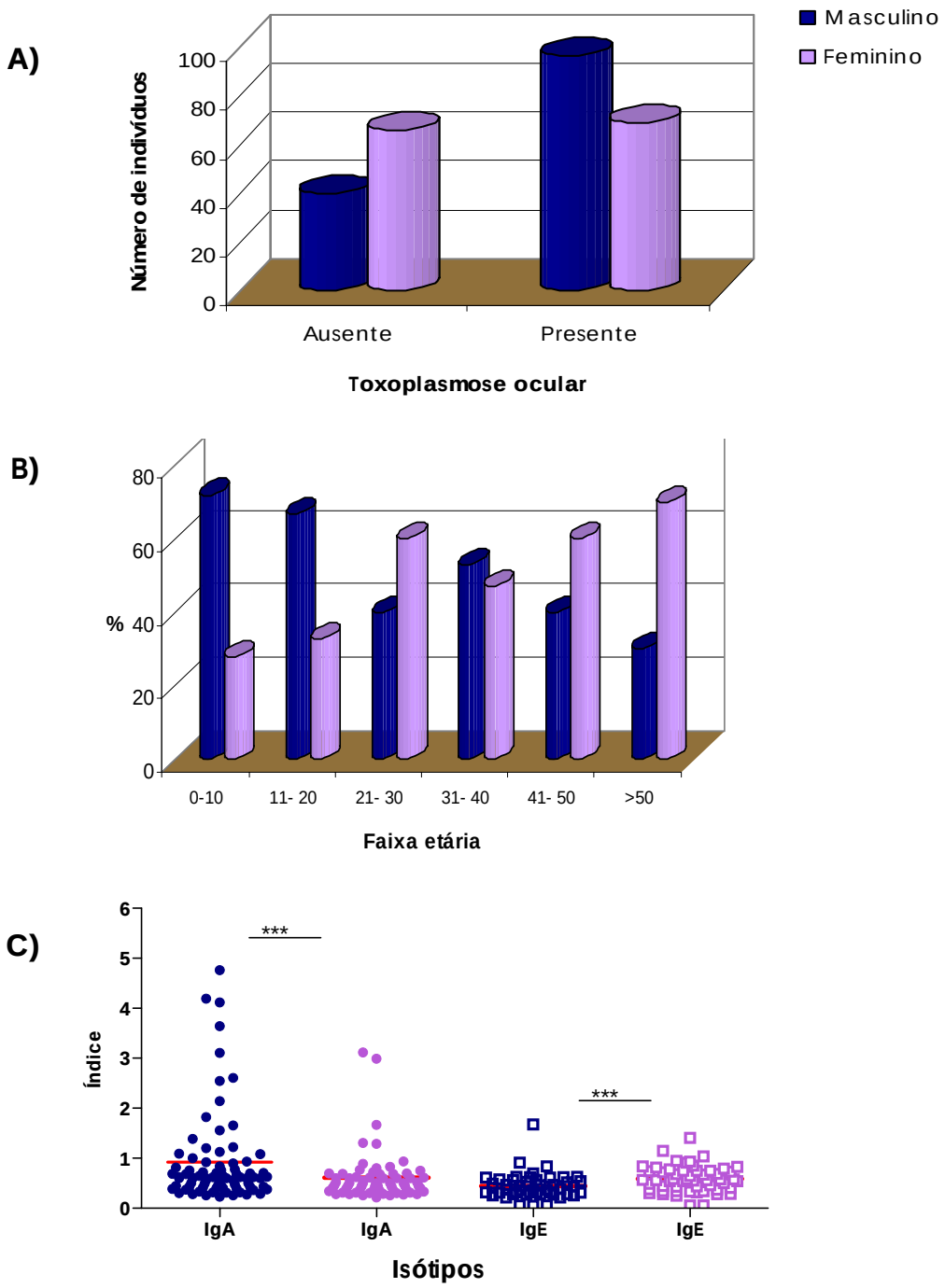


Figura 5 - **Distribuição da população estudada de acordo com o sexo, toxoplasmose ocular, faixa etária e produção dos isótipos**. A) representação gráfica do número de indivíduos do sexo masculino e feminino em relação à toxoplasmose ocular; B) representa o percentual de indivíduos de ambos os sexos distribuídos por faixa etária em anos; C) representa a produção individual de IgA e IgE anti- *T. gondii* em índice por indivíduos Soropositivo de ambos os sexo. As linhas vermelhas representam as medianas dos grupos. *** representam as diferenças estatísticas ($p<0,001$) através do teste T para análises não-pareadas, com 95% de intervalo de confiança.

4.1.2. Correlação entre os isótipos e a toxoplasmose ocular

Após as correlações feitas anteriormente, analisamos possíveis diferenças na produção dos isótipos entre os indivíduos com e sem TO. A **Figura 6** representa a produção dos isótipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE específicos para *T. gondii* nestes grupos. Observamos que em ambos os grupos houve produção de IgG1 (*cut-off* = 0,50), porém sem diferenças estatísticas. Em relação ao IgG2, a média de detecção nos mesmos grupos ficou abaixo do valor de corte (*cut-off*= 0,80). Entretanto, quando avaliamos a produção de IgG3, IgA, IgG4 e IgE observamos que houve produção significativamente maior ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$, respectivamente) entre os indivíduos sem lesão ocular. Com base nestes dados, decidimos avaliar a produção dos isótipos nos diferentes grupos clínicos e sorológicos.

Avaliamos a produção dos isótipos com os voluntários categorizados, de acordo com o perfil sorológico e apresentação clínica da toxoplasmose ocular. Os resultados que estão demonstrados na **Figura 7** nos comprovam que o isótipo IgG1 foi detectado em todos os grupos analisados. Houve produção significativamente maior de IgG2 ($p < 0,001$) no grupo IgM^+ sem lesão, quando comparado com os grupos <u>soropositivo sem TO</u> e <u>TO grave</u> ($p < 0,01$) e <u>soronegativo</u> ($p < 0,001$).

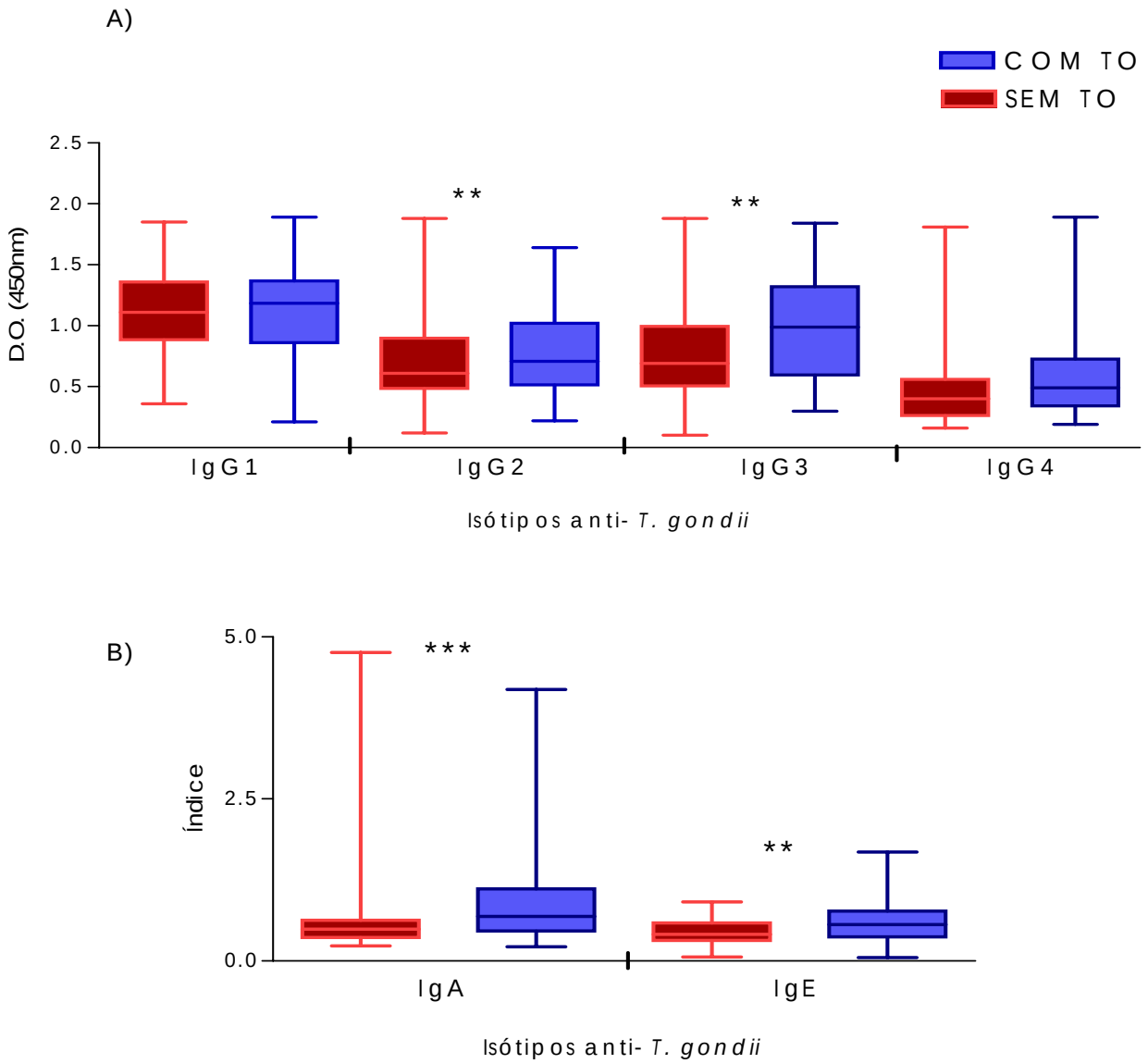


Figura 6 – Detecção de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE anti- *T. gondii* no plasma de indivíduos de Erechim-RS de acordo com a toxoplasmose ocular. Representação individual dos isótipos detectados por (A) ELISA indireto (IgG1-4) e por (B)ELISA de captura (IgA e IgE) de acordo com a presença (IgG1-4, n=156; IgA, n= 85; IgE, n= 52) ou ausência para (IgG1-4, n= 106; IgA, n= 60; IgE, n= 49) da lesão ocular. Os resultados estão expressos em densidade óptica (D.O) obtida a 450nm e em índice. Os dados estão representados em "Box plot" com distribuição em valor máximo, segundo percentil, mediana, terceiro percentil e valor mínimo para cada isótipo. (*** e **) representam as diferenças estatísticas ($p<0,0001$ e $p<0,01$, respectivamente) através do Anova seguido de Tukey para análises não-pareadas, num intervalo de confiança de 95%.

Ainda em relação ao grupo IgM$^{\pm}$ sem TO, a produção de IgG3 foi, segundo a análise estatística, significativamente maior quando comparado com os grupos TO branda, TO grave, soronegativo ($p < 0,001$) e soropositivo sem lesão ($p < 0,01$). Este dado nos levou a pensar que a presença do IgG3 no início da infecção pudesse prevenir o desenvolvimento da lesão ocular. Analisando os dados apresentados na **Tabela II**, observamos que entre os indivíduos sem toxoplasmose ocular 53% produziram IgG3 específica, enquanto na grande maioria (72%) dos indivíduos com lesão ocular este isótipo não foi detectado. Por outro lado, não houve diferença significativa na produção deste isótipo em relação ao grupo IgM^{+} com lesão, sugerindo a participação deste isótipo em infecções recentes.

Embora a produção do isótipo IgG4 tenha sido baixa na maioria das amostras analisadas, no grupo soropositivo a produção desta imunoglobulina foi significativamente maior do que nos grupos com lesão oculares, incluindo IgM$^{\pm}$ com TO e TO grave ($p < 0,01$) e TO branda ($p < 0,001$) e soronegativo ($p < 0,001$). Estes dado nos levaram a pensar, se haveria alguma relação entre a presença deste anticorpo e a proteção para o desenvolvimento da toxoplasmose ocular.

Na **Figura 7** representamos os resultados da pesquisa de IgA e IgE específicas, detectados no soro dos voluntários dos diferentes grupos. No que diz respeito à detecção de IgA, verificamos que houve produção

significativamente maior deste isótipo nos indivíduos IgM$^+$ com e sem lesão ocular em relação aos demais grupos. Outro dado interessante, agora em relação à presença de IgE, em todos os grupos as médias ficaram abaixo do valor de corte (índice= 1), porém no grupo IgM$^{\pm}$ sem TO foi detectado maior produção de IgE em relação aos demais grupos (p< 0,001).

Tabela II – Avaliação da produção de IgG3 anti- T. gondii em pacientes infectados em Erechim. Os valores representam o número de indivíduos produtores de IgG3 específica classificados de acordo com a manifestação clínica da toxoplasmose ocular

Valor de corte	Toxoplasmose ocular				
	Ausente		Presente		
	IgM$^+$	Soropositivo	IgM$^+$	Lesão branda	Lesão grave
IgG3 ≤ 0,80	17	30	7	23	87
IgG3 ≥ 0,81	45	27	12	7	50

Observação: o valor de corte definido para o isótipo IgG3 pelo método ELISA foi 0,8 de densidade óptica no comprimento de onda de 450nm. Valores iguais ou superiores a 0,81 foram considerados positivos.

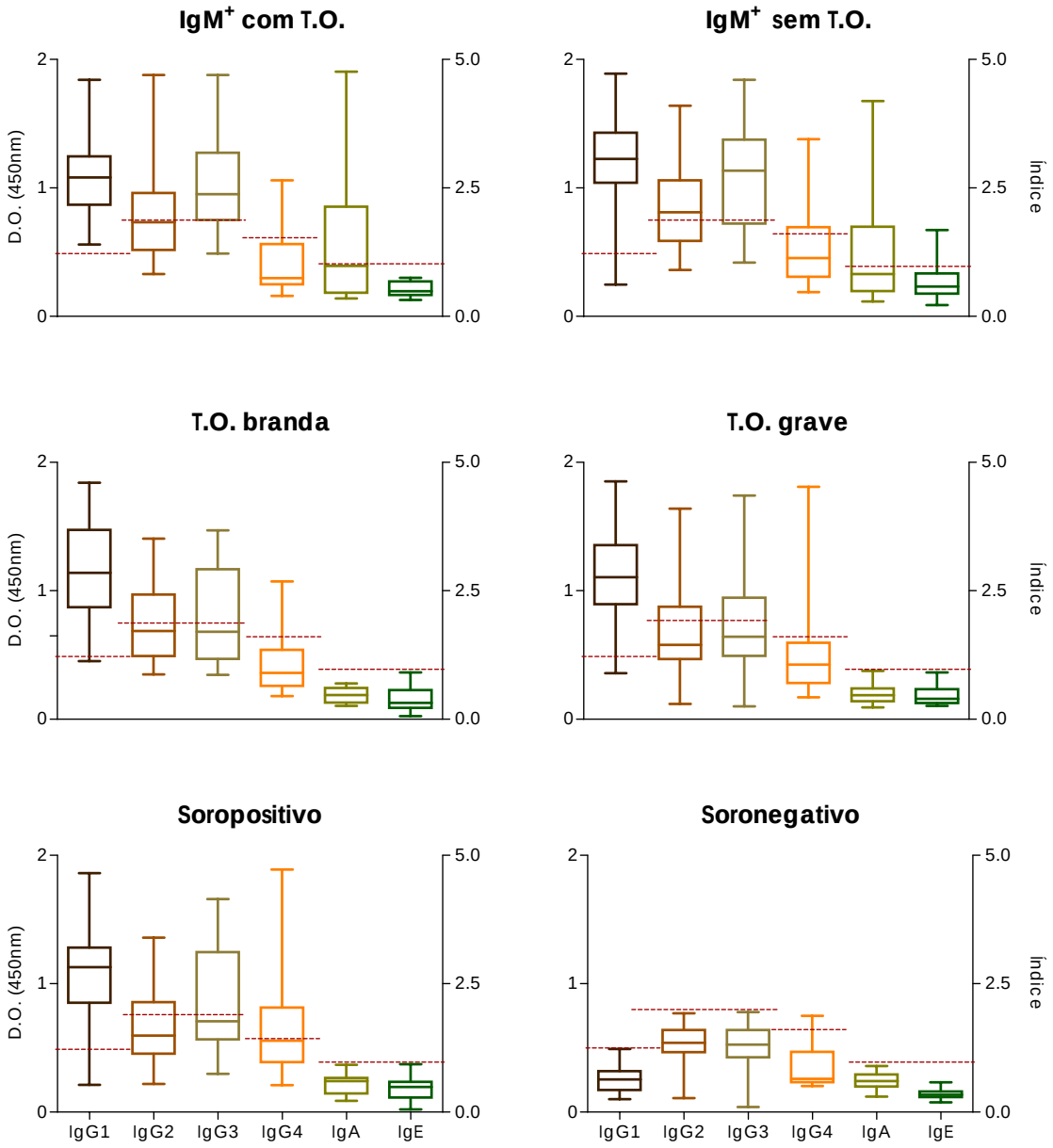


Figura 7 – Detecção de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE anti- *T. gondii* no plasma de indivíduos de Erechim-RS de acordo com o diagnóstico clínico. Representação dos isótipos detectados por ELISA indireto (IgG1-4) e por ELISA de captura (IgA e IgE) de acordo com a classificação clínica dos indivíduos: IgM^+ sem toxoplasmose ocular (TO) (n=56) – indivíduos com lesão adquirida sem lesão ocular; IGM^+ com TO (n=20) - paciente com infecção adquirida com lesão ocular; T.O branda (n=27) – indivíduos com infecção crônica e lesão ocular branda; TO grave (n=118, para subclasses de IgG; n= 54 para IgA e n= 35 para IgE) – indivíduos com infecção crônica e com lesão grave; Soropositivo (n= 50)- paciente com infecção crônica há mais de dois anos e sem lesão ocular; Soronegativo (n= 35, para subclasses de IgG e n= 30 para IgA e IgE) - indivíduos sorologia negativa para *T. gondii.* Os resultados estão expressos em densidade óptica (D.O) obtida a 450nm e em índice. Os dados estão representados em "Box plot" com distribuição dos dados em valor máximo, segundo percentil, mediana, terceiro percentil e valor mínimo para cada isótipo e as linhas pontilhadas determinam o valor de corte. Os resultados acima ou baixo do valor de corte e do índice são considerados positivos ou negativos, respectivamente.

Diante dos dados mostrando diferenças na produção dos isótipos nos grupos clínicos, investigamos se haveria correlação entre a produção destas imunoglobulinas e o tempo de infecção. Para isso, fizemos análises para correlacionar à presença do isótipo IgM, a produção dos outros isótipos (IgG1-4, IgA, IgE) e a avidez de IgG específica.

A **Figura 8** é a representação gráfica da análise ultra mencionada, na qual podemos observar que nos indivíduos IgM positiva há produção significativamente maior de IgG2, IgG ($p < 0,001$) e IgA ($p < 0,0001$) em relação aos indivíduos IgM negativa. A presença do IgM não exclui uma infecção latente, contudo nó prediz que estes indivíduos têm infecção adquirida Para investigar casos de infecção adquirida recente na população estudada, nós também analisamos a avidez de IgG.

4.1.3. Determinação do índice de avidez de IgG anti- T. gondii

Dando continuidade a caracterização da resposta imune humoral nesta população, a nossa próxima investigação foi para verificar, se os pacientes dos grupos IgM^+ tinham infecção recente ou IgM persistente. Para isso, determinamos o índice de avidez de IgG anti-*T. gondii,* o qual é considerado um marcador sorológico para diferenciar uma infecção recente ou crônica (HEDMAN *et al.*, 1989). Foram analisados 69 soros de indivíduos para a determinação do índice de avidez, sendo destes: 25 (36%) apresentaram índice de avidez baixa e 44 (64%) apresentaram avidez alta.

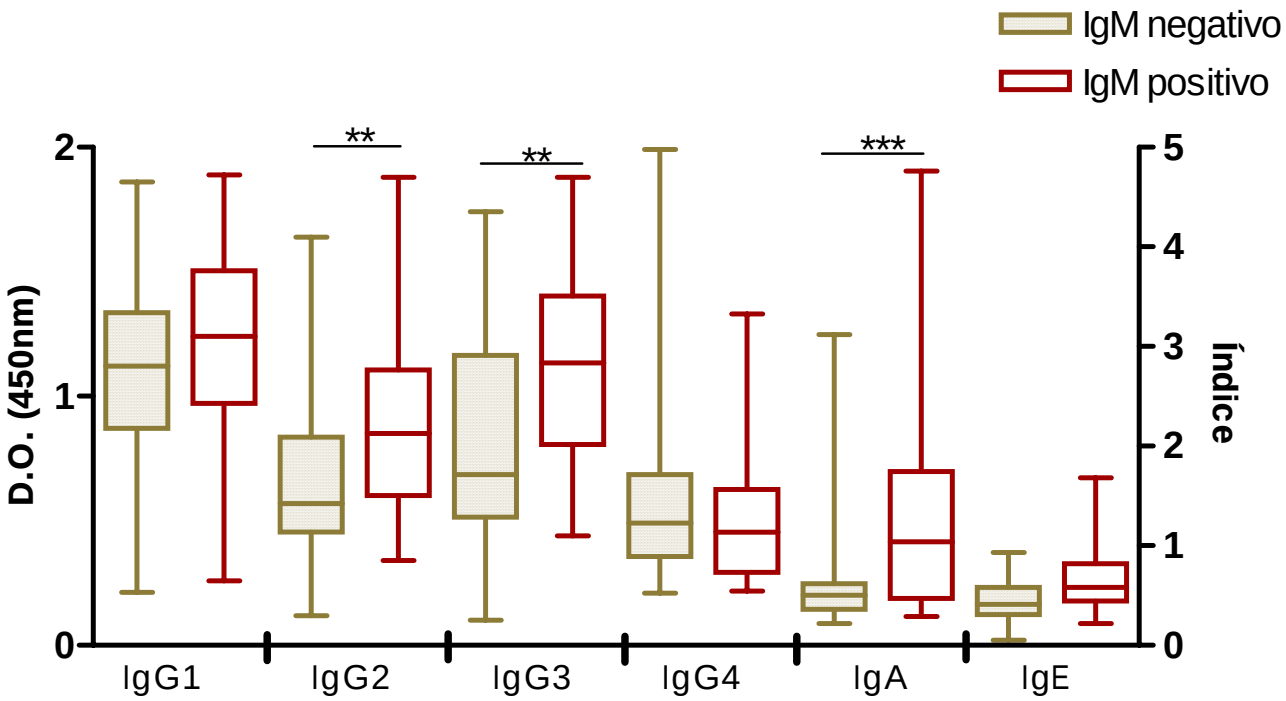


Figura 8 – Relação entre a produção dos isótipos (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE) anti- *T. gondii* e a presença de IgM específica no plasma de indivíduos de Erechim-RS. Representação gráfica dos isótipos detectados por ELISA indireto (IgG1-4) e por ELISA de captura (IgA e IgE) no plasma de indivíduos soropositivo para *T. gondii* classificados por IgM positiva (IgG1-4, n= 138; IgA, n= 102; IgE, n= 64) para ou IgM negativa (IgG1-4, n= 52; IgA, n= 42; IgE, n= 37). Os resultados estão expressos em densidade óptica (D.O) obtida a 450nm para as subclasses de IgG e em índice para IgA e IgE. Os dados estão representados em "Box plot" com distribuição dos dados em valor máximo, segundo percentil, mediana, terceiro percentil e valor mínimo para cada isótipo. *** e ** representam as diferenças estatísticas ($p<0,0001$ e $p<0,01$, respectivamente) através do teste T para análises não-pareadas, num intervalo de confiança de 95%.

Na **Figura 9** representamos os resultados individuais da pesquisa de subclasses de IgG, IgA e IgE no soro dos indivíduos em relação à avidez. Observamos que nas amostras com alto índice de avidez há produção substancialmente maior de IgG1 ($p< 0,001$). Enquanto, conforme esperado, há maior produção de IgA e IgE ($p< 0,01$) nas amostras com baixa avidez. Outra observação, nos indivíduos com infecção adquirida há predomínio dos isótipos IgG1 e IgG3, embora não seja significativa esta diferença. IgG1 é

produzida em maior quantidade nas amostras com alta avidez. Por outro lado, foi detectada a presença de IgG2 nas amostras dos indivíduos com alta avidez. Este dados em conjunto sugerem um padrão diferente de resposta na infecção adquirida recente.

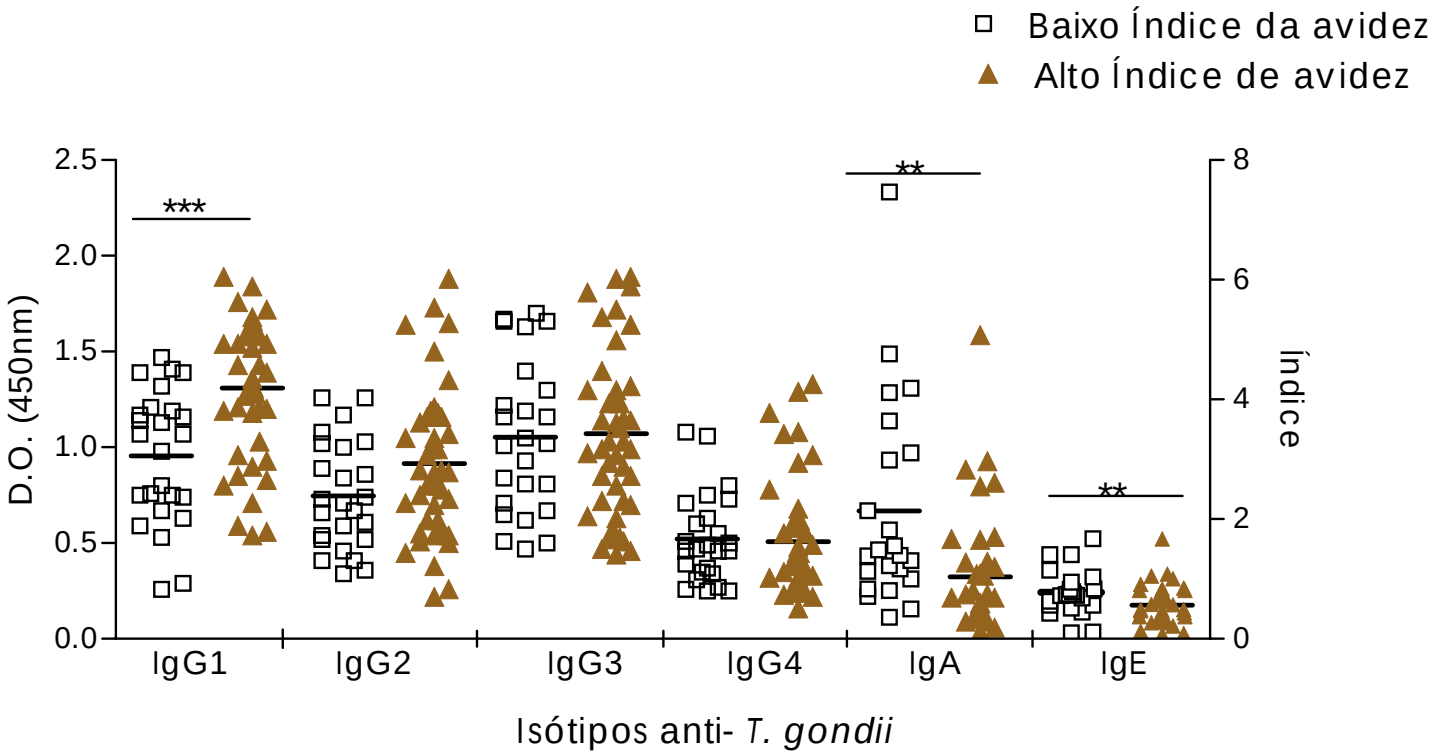


Figura 9 - Pesquisa da avidez de IgG anti-*T. gondii* em relação à detecção dos isótipos anti-*T. gondii* em soro de indivíduos de Erechim. Representação individual dos isótipos detectados por ELISA indireto (IgG1-4), expressos em densidade óptica, e por ELISA de captura (IgA e IgE), expressos em índice, o gráfico representa os resultados obtidos no plasma dos indivíduos com baixo (n=25) e alto índice de avidez (n=44) para IgG anti-*T.gondii*. ** e *** representam da diferença estatística (p<0,01 e *p*< 0,001, respectivamente) pelo teste T não-pareado num intervalo de confiança de 95%.

Para melhor entender a dinâmica da infecção, analisamos a correlação entre a produção dos isótipos. Conforme representado na **Figura 10,** há uma correlação negativa entre a produção de IgM e IgG1, enquanto que com o IgG3 esta correlação é positiva. Neste mesmo grupo, há correlação positiva entre IgG1 e IgG3 (dado não apresentados). Não foram observadas correlações em relação aos outros isótipos.

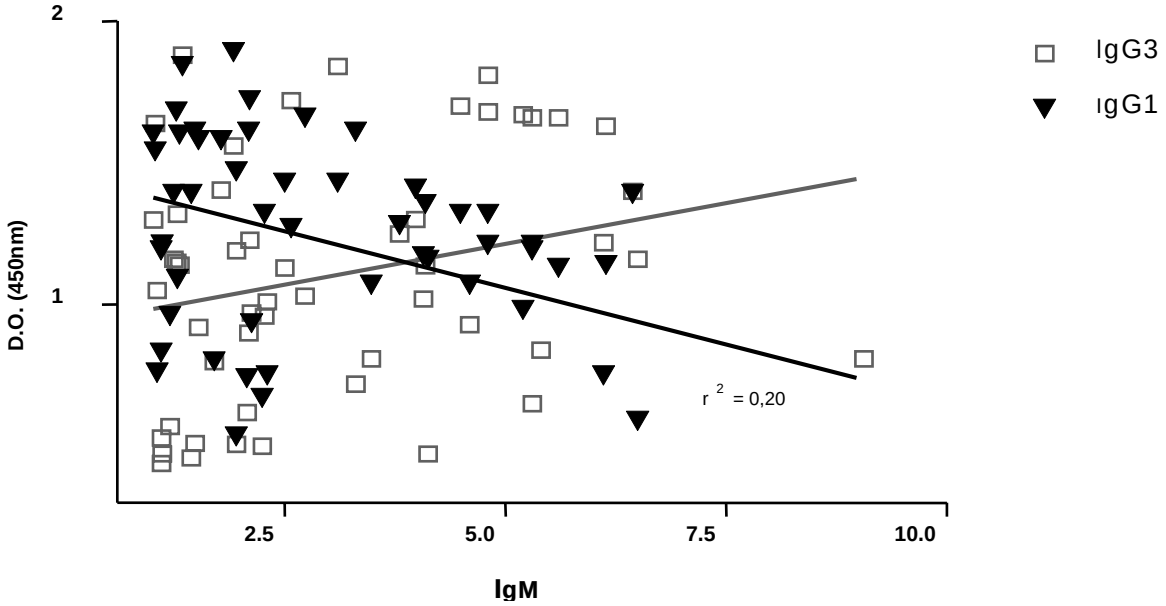


Figura 10 – Correlação entre IgM, IgG1 e IgG3 anti-*T. gondii* detectado em soro de indivíduos de Erechim. Representação da regressão linear dos isótipos detectados por ELISA indireto (IgG1 e IgG3), expressos em densidade óptica, e por ELISA de captura (IgM), expressos em índice.

4.1.4. Relação entre a produção de IgA, faixa etária e lesão ocular

Na infecção pelo toxoplasma, IgA sérica pode ser detectada no início ou em casos de recidiva. Há indícios de que a produção deste isótipo esteja associada com a ocorrência da toxoplasmose ocular em outras populações brasileiras (Portela *et al*., 2004). Avaliamos a produção de IgA anti- *T. gondii* no plasma de indivíduos da cidade de Erechim, categorizados de acordo com a faixa etária e a presença ou ausência de lesão ocular, com o objetivo de associar a presença deste anticorpo com o comprometimento ocular.

A **Figura 11** representa graficamente o percentual dos indivíduos produtores do isótipo IgA por faixa etária. Nossos resultados mostram que entre os indivíduos sem TO a produção de IgA foi maior (28%) entre adolescentes, na faixa entre 11 e 20 anos de idade. Nas faixas etárias entre 21 até 50 anos de idade a produção de IgA específica foi uniforme (21%), enquanto entre crianças e indivíduos acima de 60 anos a detecção foi menor, entre 6% e 2%, respectivamente. Destarte, entre os indivíduos com toxoplasmose ocular foi detectado IgA em 38% dos indivíduos na faixa entre 41 e 50 anos de idade, 18% nas faixas de 11 a 20, 31 a 40 e 50 a 60 anos; 2% entre os indivíduos com 21 a 30 anos, enquanto que em crianças este isótipo não foi detectado.

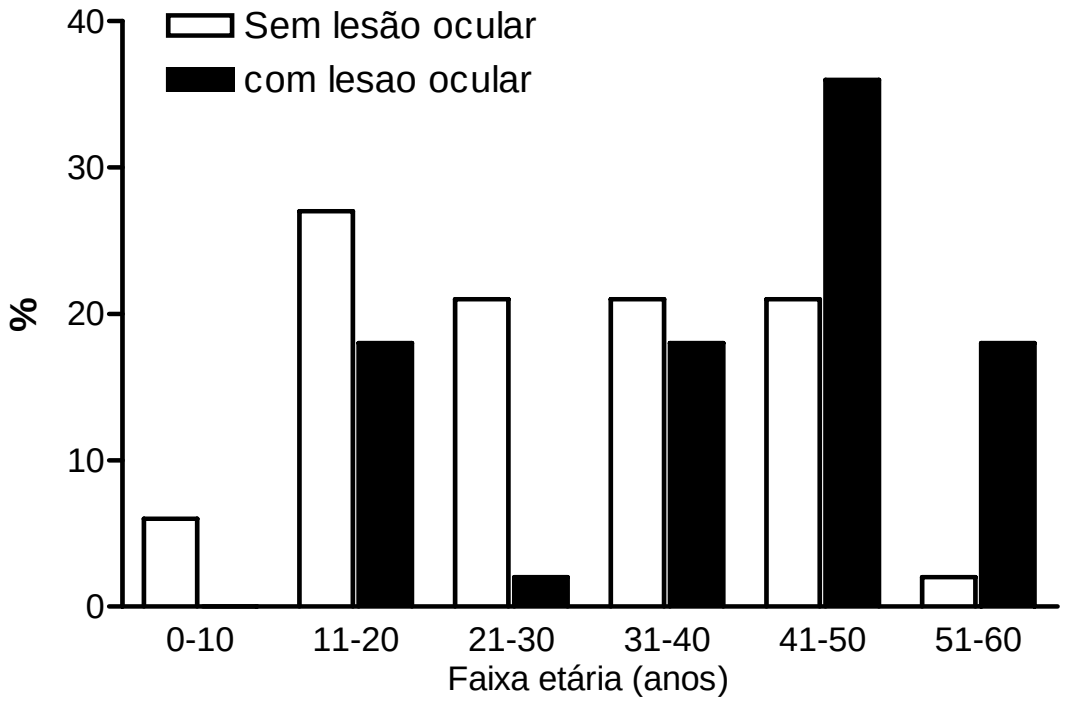


Figura 11 – Produção de IgA anti- *T. gondii* em indivíduos com ou sem lesão ocular distribuídos em faixas etárias. As barras representam o percentual de indivíduos com produção de IgA específica em cada faixa etária em anos de acordo com a ausência ou presença da lesão ocular.

4.1.5. Evolução clínica dos pacientes com toxoplasmose adquirida

Para estabelecer se a resposta imune humoral estava implicada na proteção ou gravidade da toxoplasmose ocular, realizamos o seguimento clínico dos indivíduos com toxoplasmose adquirida, ou seja, dos grupos IgM^+ com e sem lesão ocular. Estes indivíduos foram avaliados clínica e sorologicamente. Ao primeiro exame clínico, foi feita a avaliação oftalmológica para investigar o comprometimento ocular e a coleta de sangue para exames sorológicos. A coleta dos dados clínicos foi feita a partir

da re-avaliação entre dois a três anos após o primeiro exame. Estes dados encontram-se descritos no **ANEXO B.**

Dentre os 20 indivíduos que apresentaram a lesão ocular no início da infecção, 9 evoluíram para lesão branda e 8 evoluíram para lesão grave. Vale ressaltar, entre os indivíduos do grupo IgM$^{\pm}$ sem TO ao primeiro exame, algumas características clínicas são interessantes e devem ser mencionadas, tais como: a) 9 indivíduos apresentaram doença sistêmica exacerbada, com febre alta e intermitente, linfadenopatia, dores de cabeça fortes, porém não desenvolveram a toxoplasmose ocular; b) 2 indivíduos evoluíram para uma toxoplasmose branda; c) 3 indivíduos apresentaram lesão ocular grave; d) 5 indivíduos apresentaram uma toxoplasmose ocular atípica, com discreto ou raro processo inflamatório, com lesões praticamente imperceptíveis; e) A grande maioria do grupo (31 pacientes) não desenvolveu TO ou qualquer outro sintoma da toxoplasmose; f) 15 indivíduos não retornaram para avaliação clínica. Não foi encontrada associação entre a produção de anticorpos e a evolução da doença ocular.

4.2. Análise sorotípica do *T. gondii*

4.2.1. Novos padrões sorotípicos na população estudada

Com o intuito de investigar a relação entre cepa do parasita e o desenvolvimento da toxoplasmose, avaliamos a presença de anticorpos contra peptídeos cepa-específicos (**Quadro I**), em 249 soros provenientes de

indivíduos soropositivos para *T. gondii.* Através da sorotipagem (ELISA) avaliamos a presença de anticorpos contra peptídeos cepa-específicos (**Quadro I**) em 249 soros provenientes de indivíduos soropositivos para *T. gondii.*

De acordo com a reatividade contra os peptídeos, detectamos seis consistentes padrões sorotípicos nas amostras analisadas, conforme descrição a seguir: a) **Tipo I/III**– 52 amostras com reatividade contra os peptídeos 6I/III e/ou d6I/III; b) **Atípico A** – 10 amostras reagiram contra os peptídeos 6I/III e 7II; c) **Atípico B** - 9 amostras fortemente reativas contra os peptídeos 6I/III e/ou d6I/III, 6II e 7II; d) **Tipo II** – 35 amostras mostraram um padrão reativo compatível com infecção pelo Tipo II contra os peptídeos 6II, d6II e/ou 7II; e) **Atípico C** – 24 soros reagiram contra 6I/III, 6II e 7II; f) **Atípico D** (n= 119) – praticamente na maioria das amostras analisadas - 49% - não foi detectada reatividade contra os peptídeos estudados. Todas as amostras avaliadas reagiram positivamente contra o lisado do *T. gondii* e o SAG1, os quais foram usados como controles positivos. Os dados destas análises estão sumarizados na **Figura 12.**

Para validação dos nossos resultados, analisamos 40 amostras provenientes de 20 indivíduos obtidas a partir de diferentes coletas, num ensaio duplo-cego, utilizando a mesma metodologia para a sorotipagem da cepa. Os resultados apresentados na **Tabela III** mostram que o padrão de

resposta aos peptídeos se mantêm nas diferentes amostras, como por exemplo nas amostras nº. 297, 129 e 134, que foram coletadas com intervalo de quase dois anos. Em 3 de 20 indivíduos obtivemos reatividade compatível com infecção pela cepa do Tipo II, sendo que um paciente respondeu apenas para os peptídeos do GRA-6 e os outros somente para GRA-7. Em 5 pacientes detectamos reatividade característica para infecção pelo tipo I/III. Os padrões de resposta atípicos se mantêm, inclusive em 8 indivíduos permaneceu a ausência de reatividade aos peptídeos, que é definida como sendo infecção pelo sorotipo **atípico D**.

Também apresentamos na **Tabela III**, a evolução clínica da infecção nestes pacientes, mostrando que a maioria (5/9) dos pacientes infectados com o sorotipo Atípico D, evoluiu para a forma grave da doença ocular. Estes dados sugerem que a ausência de resposta nestes indivíduos para os peptídeos é uma característica da infecção e não do estado imunológico do paciente.

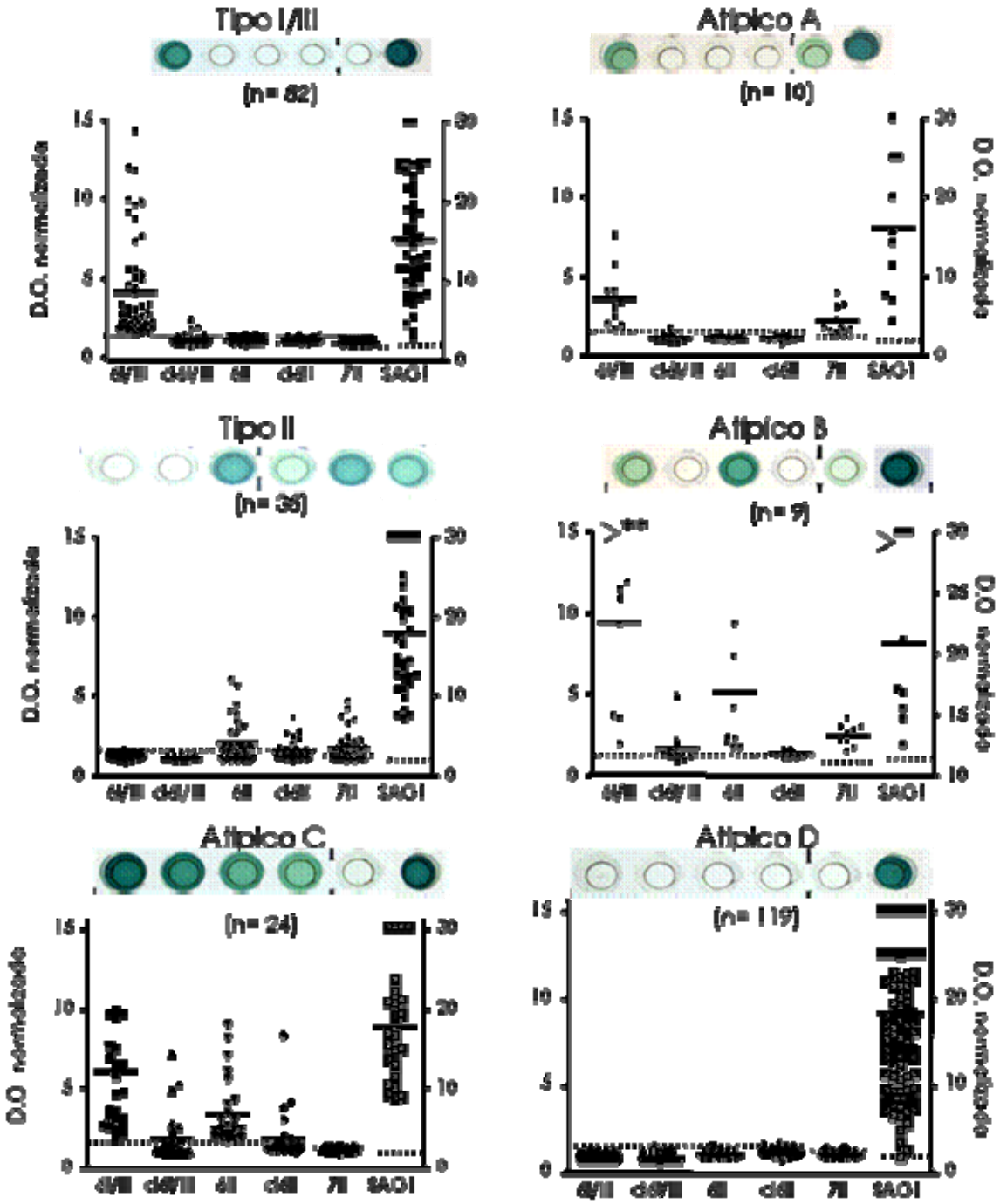


Figura 12 – Análise sorotípica do *Toxoplasma gondii*. Sorotipos detectados em 249 soros dos pacientes de Erechim- RS em resposta aos peptídeos cepa específicos: 6I/III, d6I/III, 6II, d6II, 7II e SAG1. O eixo Y de cada gráfico representa o valor da densidade ótica normalizado para os peptídeos (esquerda) e SAG1 (direita). As linhas pontilhadas representam os valores de *cut-off* . Cada gráfico representa um perfil detectado de acordo com a reatividade dos soros contra os peptídeos 6I/III e d6I/III (tipo I); 6I/III e 7II (Atípico A); 6II, d6II e 7II (Tipo II), 6I/III, d6I/III, 6II, d6II e 7II (Atípico B); 6I/III, d6I/III, 6II, d6II (Atípico C); Atípico D significa que não foi detectada reatividade positivo contra nenhum dos peptídeos analisados. A media de cada grupo está representada por linhas cheias.

Tabela III. Avaliação duplicada de Indivíduos de Erechim- Rs. Amostras de soro ou plasma de coletas diferentes de indivíduos da Clínica Silveira foram avaliadas para pesquisa de anticorpos cepa-específicos. As amostras foram coletadas em intervalos de meses ou anos. Os valores representam a média da triplicata da densidade óptica normalizada detectada no soro dos indivíduos por ELISA indireto para cada um dos peptídeos cepa-específicos (6/I/III, d6I/III, 6II, d6II, 7II).

Nº Paciente	Data da coleta	Grupo clínico	Peptídeos cepa-específicos					Sorotipo da cepa
			GRA-6				GRA7	
			6I/III	d6I/III	6II	d6II	7II	
00297	Maio-03 Mar-o5	Soropositivo sem TO	10,9 11,5	1,2 1,4	7,3 9,3	1,1 1,6	2,1 2,8	Atípico A
00129	Maio-03 Mar-05	Soropositivo sem TO	10.9 11.5	1.2 1.4	7.3 9.3	1.1 1.6	2.1 2.8	Atípico B
00223	Out.-02 Jul.-04	TO Grave	3.7 Over	1.6 7.1	1.7 6.0	1.2 4.1	1.3 1.0	Atípico C
00241	Jan.-05 Mar-05	TO Grave	6.4 5.6	1.5 1.1	2.3 2.0	1.4 1.4	1.1 1.0	Atípico C
00134	Abril-03 Jun.-05	TO Grave	1.2 1.2	1.0 1.1	1.1 0.9	1.1 1.0	0.9 1.1	ATÍPICO D
00015	Ago.-02 Out.-02	IgM⁺ sem TO Soropositivo sem TO	1.2 1.3	1.1 0.9	1.1 1.0	1.1 1.0	1.0 0.9	ATÍPICO D
00003	Abril-02 Dez-02	Soropositivo sem TO	1.4 1.1	1.0 1.1	1.0 1.1	1.1 1.1	0.8 0.9	ATÍPICO D
00269	Maio-01 Fev.-03	IgM⁺ com TO TO Grave	1.2 0.8	1.1 1.0	1.0 0.9	1.2 1.1	1.1 0.8	ATÍPICO D
00238	Maio-03 Jan.-05	TO Grave	1.3 1.2	1.0 1.1	1.0 1.0	1.4 1.6	1.3 1.2	ATÍPICO D
00024	Out.-02 Maio-03	TO Branda	1.0 1.2	1.0 0.9	1.0 0.9	1.1 1.3	1.1 1.1	ATÍPICO D
00080	Mar-03 Jun.-03	TO Grave	0,9 1,0	1,0 1,2	0,9 1,2	1,0 1,2	1,0 1,2	ATÍPICO D
00236	Dez.-04 Fev.-05	IgM⁺ com TO TO Grave	1.1 1.0	0.9 1.0	0.9 1.0	1.0 1.2	1.0 1.0	ATÍPICO D
00113	Nov.-02 Out.-02	Soropositivo sem TO	4.9 2.4	1.1 1.0	1.1 1.0	1.1 1.2	1.1 0.9	Tipo I/III
00275	Jul.-02 Jun.-05	TO Grave	3.1 2.6	1.0 0.8	1.0 0.8	1.3 1.1	1.0 0.8	Tipo I/III
00072	Ago.-02 Mar-03	Soropositivo sem TO	2,3 2,4	1,1 1,1	1,0 1,0	1,1 1,1	1,0 1,0	Tipo I/III
00280	Mar-05 Maio-05	TO Branda	12,0 11,8	1,0 1,3	1,4 1,1	1,1 1,0	1,3 1,3	Tipo I/III
00087	Jul.-03 Ago.-03	IgM⁺ sem TO	2.5 3.2	1.3 1.5	1.2 1.2	1.0 1.1	0.9 1.1	Tipo I/III
00005	Jul.-02 Abril-03	IgM⁺ com TO TO Grave	1.3 1.1	1.1 1.1	2.0 1.9	1.3 1.8	1.4 1.0	Tipo II
00268	Dez.-00 Maio-02	TO Grave	1.5 1.3	1.0 1.2	1.1 1.0	1.5 1.3	3.3 1.7	Tipo II
00052	Out.-02 Fev.-03	TO Branda	1.0 0.9	0.9 1.0	0.9 0.9	0.9 1.1	1.5 1.7	Tipo II

Abreviações: TO: toxoplasmose ocular; GRA: proteína do grânulo denso

4.2.2. Associação entre os sorotipos e a toxoplasmose ocular.

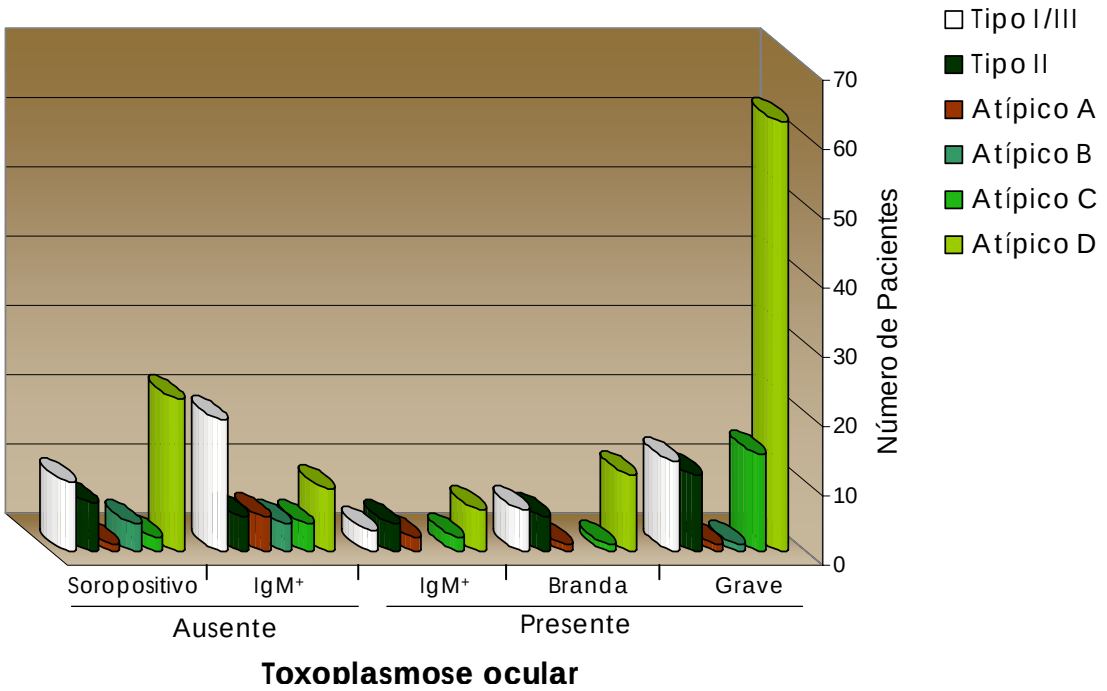
Diante da observação de que diferentes cepas poderiam ser responsáveis pela infecção dos indivíduos estudados, nós investigamos se havia alguma correlação entre a gravidade da toxoplasmose e a cepa infectante. A **Figura 13** mostra a relação entre o número de indivíduos, classificados de acordo com o sorotipo do *T. gondii*, ou seja, de acordo com o padrão de resposta detectado para cada peptídeo cepa-específico, e a apresentação clínica da toxoplasmose ocular. Nesta análise foram incluídas 235 amostras de pacientes soropositivos, assim distribuídos: IgM$^{\pm}$ sem TO - 46 amostras; IgM$^{\pm}$ com TO - 17 amostras; soropositivo sem TO - 46 amostras; TO branda - 24 amostras; TO grave - 102 amostras.

Em relação à gravidade da doença ocular, nossos dados mostram que entre indivíduos com TO grave a grande maioria (61%) não reagiu contra os peptídeos, sugerindo um padrão de infecção pelo sorotipo **Atípico D**. Há de se verificar que, entre os indivíduos com infecção adquirida sem lesão ocular (IgM$^{\pm}$ sem TO) detectamos o sorotipo I/III em 41% das amostras. Quando comparamos os sorotipos em relação à presença ou ausência de toxoplasmose ocular, verificamos que 55% dos indivíduos com lesão ocular estão infectados com o sorotipo **Atípico D** e 33% dos indivíduos sem lesão, estão infectados pelos **sorotipo I/III** (ver Tabela na **Figura 13**).

Nossa próxima avaliação foi verificar se entre os 57 indivíduos dos grupos IgM^{+} com e sem TO que foram clinicamente acompanhados (**ANEXO**

III) esta correlação entre a clínica e os sorotipos também prevaleceria. Os resultados estão representados graficamente na **Figura 14**, mostram que 10 de 20 (50%) indivíduos que evoluíram para toxoplasmose ocular grave estavam infectados pelo sorotipo **Atípico D**. Enquanto, 11 de 24 (46%) indivíduos que não desenvolveram lesão ocular estavam infectados pelo sorotipo **I/III** do *T. gondii*. Outro dado interessante, entre os indivíduos infectados pelo **Atípico D**, 71% desenvolveram lesão grave, 21% lesão branda e 8% não desenvolveu lesão ocular. Em contrapartida, entre os indivíduos infectados pelo **Tipo I/III**, 64% não desenvolveram TO, 23% desenvolveram lesão branda e, apenas, 13% lesão grave. Não foi encontrada nenhuma relação entre os demais sorotipos e a doença ocular. Este conjunto de dados sugere que além da caracterização da cepa, o método da sorotipagem pode sugerir o prognóstico da infecção.

A)



B)

Sorotipo	Toxoplasmose ocular Ausente (%)	Presente (%)
Tipo I/III	31,5	14,0
Tipo II	13,0	15,4
Atípico A	6,5	2,8
Atípico B	16,7	2,1
Atípico C	6,5	11,9
Atípico D	33,7	55,2

Figura 13. Associação entre a cepa infectante e a toxoplasmose. A) Representação gráfica do número de indivíduos por grupo estudado (soropositivo (n=46), IgM$^+$ sem TO (n=46), IgM$^+$ com TO (n=17), TO branda (n= 24), TO grave (n= 102) e a classificação do sorotipo infectante do *T. gondii*. B) Representação tabular do percentual de pacientes infectados pelos sorotipos de acordo com a presença ou ausência da lesão ocular. A descrição dos sorotipos encontra-se na **Figura 12**.

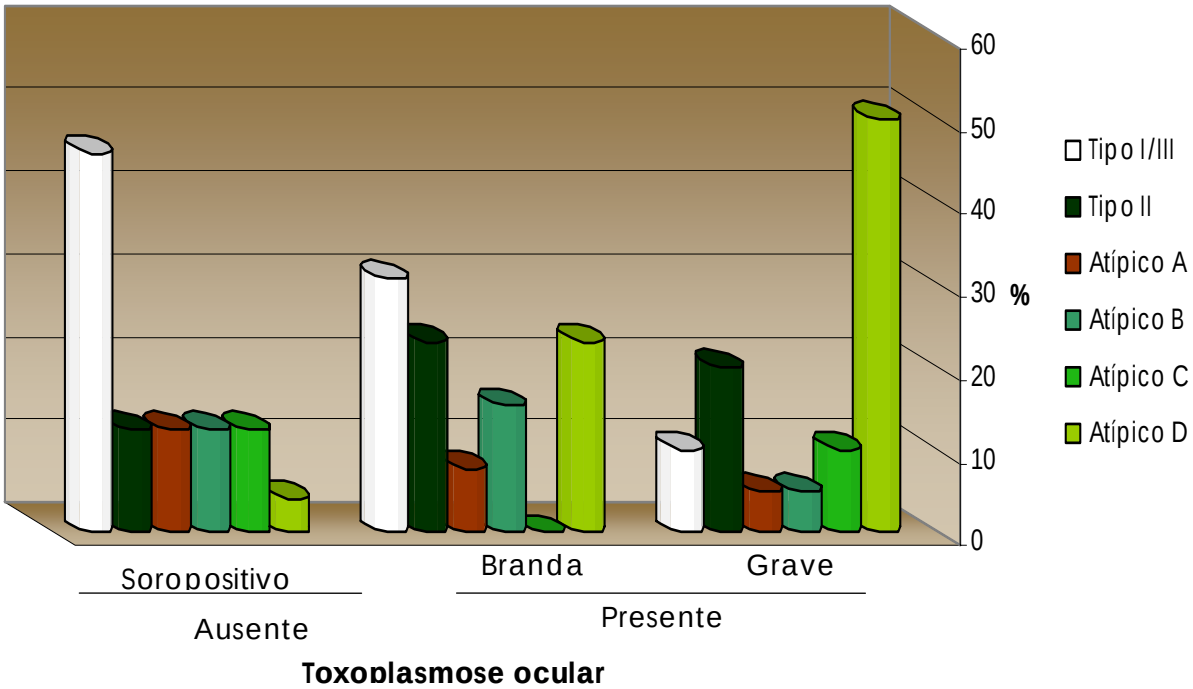


Figura 14. Associação entre a evolução clínica das pacientes com toxoplasmose adquirida e cepa infectante. Representação gráfica do percentual de indivíduos dos grupos IgM^+ com e sem lesão ocular de acordo com a evolução clínica após 3 anos de infecção e o sorotipo da cepa. Do total de 57 pacientes, 20 são soropositivos sem TO, 13 desenvolveram leão ocular branda e 20 desenvolveram lesão grave. A descrição dos sorotipos encontra-se na **Figura 12.**

4.2.3. Atípicos sorotipos do Toxoplasma gondii infectam indivíduos no Sul do Brasil

No decorrer deste trabalho ocorreram dois surtos de toxoplasmose no Sul do Brasil, tivemos a oportunidade de fazer o estudo de sorotipagem com o plasma de 14 indivíduos provenientes dos lugarejos chamados: Agronômica, em Santa Catarina e Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul. Os resultados destas análises, que estão sumarizados na **Tabela IV**, nos mostram que na maioria das amostras dois sorotipos atípicos foram predominantemente detectados. Em Agronômica em 5 das 7 amostras foi detectado o padrão - **Atípico A** - como responsável pela infecção, enquanto que nas amostras de Santa Vitória do Palmar em 5 dos 7 indivíduos detectamos o sorotipo **Atípico B**. Nas duas populações foram detectados **sorotipos II**, mas não foi detectado o **tipo I/III**. Amostras de DNA destes pacientes foram avaliadas por KHAN e colaboradores (2006), e neste estudo também foram detectadas cepas atípicas como responsáveis pela infecção em ambos os lugares. Correlacionamos as amostras analisadas por Khan e colaboradores (2006), para genotipagem àquelas analisadas em nosso estudo. Segunda a classificação da Clínica Silveira, as amostras 413 e 418 (**Tabela IV**), correspondem, respectivamente, aos números 2644 e 2712 analisadas genotipicamente.

O estudo de genotipagem destas amostras, também sugere que há padrões genéticos atípicos nas amostras do sul do Brasil. Na amostra nº. 413 (**Tabela IV**), na qual detectamos o **Atípico A**, foi detectado o genótipo I, II

ou III, enquanto na amostras nº. 418 (**Tabela IV**), cujo sorotipo é o **Atípico B**, foi detectado o genótipo I ou II (KHAN *et al*., 2006).

Tabela IV. Avaliação sorotípica das cepas de *T. gondii* a partir de indivíduos **infectados em surtos na Região Sul do Brasil.** Amostras de soro, provenientes de 7 indivíduos de Agronômica – Santa Catarina e Santa Vitória do Palmar – Rio Grande do Sul, foram avaliadas pelo método ELISA para a resposta contra peptídeos cepa-específicos do *T. gondii.* Os resultados estão representados em densidade óptica normalizada. Valores superiores a 1,5 são considerados reagentes.

Origem	nº Paciente	Peptídeos						Sorotipo
		6I/III	d6I/III	6II	d6II	7II	SAG1	
Agronômica	410	8,7	1,1	1,0	1,3	2,1	Over	Atp A
	411	1,9	1,1	1,0	1,5	2,0	13,2	Atp A
	412	1,4	1,1	18,2	17,4	1,1	Over	II
	413	1,8	1,2	1,0	1,0	1,7	19,7	Atp A
	414	1,9	1,0	1,1	1,0	1,9	20,1	Atp A
	415	1,1	1,0	4,8	1,1	1,0	19,7	II
	416	3,3	1,0	1,1	1,0	1,9	8,7	Atp A
Santa Vitória do Palmar	417	2,0	1,2	1,7	1,6	1,9	13,8	Atp B
	418	11,2	4,7	8,0	2,0	3,9	20,6	Atp B
	419	1,3	1,2	1,8	3,2	1,1	6,3	II
	420	3,1	2,5	2,3	1,9	1,7	20,3	Atp B
	421	1,1	1,0	3,6	1,3	1,2	9,1	II
	422	2,6	1,7	1,8	1,5	2,7	Over	Atp B
	423	7,0	2,1	3,7	1,7	4,0	Over	Atp B

Abreviações: Over: resultado superior ao limite de detecção do método; Atp A: sorotipo atípico A; II: sorotipo II; Atp B: sorotipo atípico B.

5. Discussão

A retinocoroidite toxoplásmica é uma doença que pode levar a seqüelas graves em indivíduos imunodeficientes e imunocompetentes. A resposta imune é capaz de controlar a proliferação do *T. gondii*, porém restam os cistos que são resistentes a estas defesas. A resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. gondii* é criticamente dependente de IFN-γ, produzidos por células NK e linfócitos T CD4+ e T CD8+ (YAP e SHER, 1999). Assim sendo, esta parece depender também da resposta humoral. Anticorpos contra o parasita são prontamente sintetizados em resposta à infecção, tanto nos seres humanos como nos modelos experimentais (FRENKEL *et al.,* 1991; ASAI *et al.,* 1992).

A diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção sistêmica é crucial para o entendimento da dinâmica da doença e para a identificação de pacientes com risco para o desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica. Permitindo, desta maneira, estabelecer estratégias preventivas e terapêuticas, minimizando os riscos para o paciente (HOLLAND *et al.,* 1996; MONTOYA e REMINGTON, 1996). Neste estudo, fizemos uma abrangente caracterização da resposta imune humoral de indivíduos infectados com diferentes classificações clínicas e sorológicas. Dois objetivos principais nortearam esta etapa da investigação: 1) associação entre a produção dos isótipos e a evolução clínica da toxoplasmose ocular; 2) estabelecer a dinâmica da resposta

imune humoral na infecção recente e crônica, através da detecção de anticorpos no plasma de indivíduos com diferentes tempos de infecção.

O principal indicador da fase aguda da toxoplasmose é a soroconversão, definida a partir de um título negativo de IgM ou IgG para um título positivo do anticorpo ou pelo aumento de quatro vezes do título de IgG, num intervalo de pelo menos três semanas (WALLACH, 1996). Alguns estudos sugerem a determinação consecutiva dos níveis séricos de IgM, durante algumas semanas, para observar se foi estabelecida à resposta imune específica neste período. Entretanto, eventuais variações individuais na resposta imune, podem levar à produção persistente de IgM e IgA anti-toxoplásmicas por longos períodos, comprometendo o diagnóstico preciso (STEPICK-BIEK *et al.,* 1990, TURUNEM *et al.,* 1983; LIESENFELD *et al.,* 1997).

Anticorpos IgG são geralmente detectáveis a partir da segunda semana (HAYDE *et al.,* 1995), após este período mantêm-se elevados, com ou sem diminuição de IgM. Em nosso estudo, dos 76 indivíduos com IgM positiva, apenas 23 apresentaram baixo índice de avidez, sugerindo que a grande maioria destes pacientes apresenta IgM persistente. Glasner e colaboradores (1992) observaram na população de Erechim uma correlação positiva entre presença de IgG anti-*T. gondii* e a toxoplasmose ocular. Nestes indivíduos a prevalência da toxoplasmose ocular aumenta com a idade e a principal forma de infecção é pela via adquirida e não pela forma congênita (SILVEIRA *et al*., 1988).

Na toxoplasmose adquirida a combinação da análise dos três isótipos (IgG, IgM e IgA) e a cinética destes (TURUNEN *et al.,* 1983) podem, em alguns casos, diferenciar entre uma infecção recente ou antiga. Curiosamente, em casos de toxoplasmose ocular por infecção congênita, são detectados baixos títulos de IgG, principalmente na retinocoroidite ativa, devido à reativação da infecção congênita pelo *T. gondii*, enquanto a IgM é usualmente não detectado (MONTOYA *et al.,* 2002).

Visando entender, de que maneira a resposta imune dos pacientes poderia estar implicada com a proteção ou desenvolvimento da lesão ocular, pesquisamos a resposta imune humoral em amostras de plasma de 327 indivíduos, classificados em: infecção adquirida recente, com e sem lesão ocular e infecção crônica com lesão grave, branda e sem lesão. Para isto, desenvolvemos em nosso laboratório ensaios de ELISA para detecção de subtipos de IgG (IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA e IgE específicos contra antígenos do *T. gondii*. Além da pesquisa de IgM e avidez de IgG com kits comerciais.

As análises pelo método ELISA para os diferentes isótipos foram padronizados utilizando-se como antígeno as proteínas solúveis do extrato protéico da forma taquizoíta (STAg). Embora alguns trabalhos da literatura discutam a necessidade de utilizar diferentes componentes antigênicos do parasita para a pesquisa dos isótipos, nós optamos pelo uso do supracitado por ser a forma antigênica mais utilizada nas pesquisas laboratoriais clínicas. O STAg contém várias proteínas, sendo

que a principal delas é uma proteína de peso molecular entre 25 a 32 Kda (p30) ou SAG1 (do inglês, *surface antigen* -1). O SAG1 é uma das cinco proteínas de superfície de membrana ancoradas na camada lipídica - glicofosfatidilinositol (GPI) descrita com um dos principais alvos para a produção de anticorpos, durante as fases aguda e crônica da infecção em seres humanos e, por isso, é a proteína mais utilizada em pesquisas sorológicas (MINEO, CAMARGO e FERREIRA, 1980; HANDMAN e REMINGTON, 1980). Em modelos experimentais, a imunização com a p30 ou a transferência de células que reconhecem esta proteína confere imunidade em infecções posteriores com o parasita intacto (PAVIA *et al.,* 1992; KASPER *et al.,* 1993; KHAN *et al.,* 1994). Anticorpos anti-p30 inibem a infecção de células do hospedeiro in vivo (SANTORO *et al*. 1985).

Durante o processo de padronização dos ELISAs dos isótipos, tivemos dificuldades para estabelecer os valores de corte para cada teste, uma vez que a definição destes valores recai no estabelecimento de sensibilidade e especificidade da metodologia testada. O nosso maior desafio foi estabelecer os verdadeiros positivos, uma vez que a produção dos isótipos varia individualmente e de acordo com os estágios da infecção.

Para superar esta dificuldade, analisamos amostras de 35 voluntários soronegativos provenientes de Erechim. Estas amostras foram analisadas em triplicata por ELISA, indireto e de captura, para cada isótipo, para assim definirmos a média, desvio padrão, valor mínimo e máximo. Com base nestas definições, decidimos que o valor de corte,

para cada isótipo, seria a média mais duas vezes o desvio padrão das densidades óticas obtidas (**Anexo C**). Uma vez definidos os valores de corte, verificamos através da aplicação de análises estatísticas e da curva ROC, qual seria a sensibilidade e especificidade do nosso método para cada isótipo (**Anexo E**). A sensibilidade e a especificidade são critérios de validade resultantes da comparação do teste com a verdade. Portanto, para se expressar objetivamente os dois critérios, com relação a um teste, é preciso comparar seus resultados com aqueles obtidos por um exame de referência. Em nosso caso, por não haver um teste de referência para fins comparativos, principalmente no caso das subclasses de IgG, a nossa definição foi baseada nos controles negativos, priorizando-se a especificidade em relação à sensibilidade.

Em concordância com os dados da literatura, os resultados apresentados neste estudo mostram que o anticorpo IgG1 foi a subclasse de IgG predominante em todos os grupos analisados. Dentre as subclasses, IgG1 é a subclasse mais abundante no soro humano normal e já foi demonstrado que na toxoplasmose a produção deste anticorpo também se mantém elevada (HUSKINSON *et al.,* 1989; PORTELA *et al.,* 2004). Entre os indivíduos IgM positivo, nós observamos uma correlação negativa entre IgG1 e IgM. Além disso, há produção significativamente maior deste anticorpo nos pacientes com alta avidez de IgG (**Figura 8**). Sugerindo que a produção deste isótipo aumenta com a evolução da infecção.

Em relação aos outros isótipos, foi detectada correlação positiva entre IgG3 e IgM (**Figura 9**), houve produção significativamente maior de IgG2 e IgG3 entre os indivíduos com IgM positiva em relação aos indivíduos IgM negativa, sugerindo que os isótipos IgG2 e IgG3 são mais precocemente produzidos do que IgG1. Em infecções congênitas, os recém-nascidos produzem primeiramente IgG2 e IgG3 contra antígenos recombinantes do *T. gondii*, enquanto o IgG1 é predominante entre isótipos transferidos maternalmente (BUFFOLANO *et al.,* 2005).

Alguns resultados importantes devem ser ressaltados em relação ao grupo IgM^+ sem TO. Primeiro, quando comparamos a produção de IgG3 em relação à presença da TO, verificamos que nos indivíduos sem lesão ocular a produção deste anticorpo foi significativamente maior. Segundo, neste mesmo grupo a produção de IgG3 foi estatisticamente maior em relação à produção deste isótipo nos grupos lesão grave, branda ($p< 0,001$) e soropositivo. Terceiro, a produção de IgG2 também foi significativamente maior nos grupos IgM^+ sem TO em relação aos grupos de infecção crônica com lesão e sem lesão ($p< 0,001$). Quarto, quando avaliamos individualmente os pacientes em que foram coletadas mais de uma amostra, observamos que na maioria dos pacientes foi detectado IgG3 e/ou IgG2 e, raramente, IgG1 na primeira coleta, porém na segunda amostra, IgG3 diminui ou desaparece, IgG2 permanece e IgG1 é predominante (dado apresentado no **ANEXO B**). Apesar do número de pacientes ser pequeno para este tipo de análise, esta observação nos sugere a dinâmica da produção dos isótipos na infecção. Ainda que

investigações mais aprofundadas sejam necessárias, estes dados sugerem a importância destes isótipos nas infecções recentes.

É importante relembrar que o nosso critério para estabelecer infecção foi a presença de IgM e baixa avidez. Embora tenha sido detectada a presença de anticorpos IgM em todos os pacientes dos grupos IgM^+, vale ressaltar que nem todos os indivíduos têm infecção recente. Em infecções pelo *T. gondii* a presença deste isótipo pode persistir por longos períodos e, portanto, o uso exclusivo deste parâmetro não seria um marcador para infecção aguda (HALL *et al.,* 1983).

Observamos que nos indivíduos com infecção crônica sem lesão ocular houve produção de IgG1 (92%) e, curiosamente, a produção de IgG4 foi significativamente maior em relação aos grupos lesão grave e branda ($p < 0,01$). A produção do isótipo IgG4 na resposta imune humoral em humanos está associada à exposição repetida ao antígeno ou infecções crônicas (AALBERSE *et al.,* 1983; HUSKINSON *et al.,* 1989). A presença deste anticorpo foi detectada em pacientes com outras infecções crônicas, como esquistossomose (ISKANDER *et al.,* 1981) e filariose (OTTESEN *et al.,* 1985) e em diversos casos de doenças alérgicas (BRUYNZEEL e BERRENS, 1979; GWYNN *et al.,* 1982). No entanto, em nosso estudo este anticorpo não foi detectado no soro da maioria dos pacientes.

Biologicamente, os anticorpos IgG1 e IgG3 se distinguem de IgG2 e IgG4 pela alta eficiência na fixação do complemento e na capacidade de interação com receptores Fc de macrófagos, sendo, portanto, efetivas opsoninas. O anticorpo IgG3, em relação as demais subclasses, apresenta

alta taxa catabólica fracionada e baixa meia-vida (GIAMMANCO *et al.,* 2003). A produção do IFN-γ por células Th1 é responsável pela troca de classes e produção de IgG1 e IgG3 em humanos em pacientes lepromatosos (HUSSIAN *et al.,* 1999). IgG1 e IgG3 são as mais freqüentes subclasses detectadas no soro humano em resposta a antígenos protéicos. A deficiência de IgG3 está associada à história de infecções recorrentes, levando à doença pulmonar crônica, além disso, a_diminuição dos níveis de IgG3 freqüentemente está associada à deficiência de IgG1 (HERROD *et al.,* 1993).

Estudos prévios com a população de Erechim, sugerem que a resistência à infecção está relacionada à habilidade de secreção de IL-12 e IFN-γ, como observado nos indivíduos soropositivos sem lesões oculares. Em contrapartida, nos indivíduos com toxoplasmose ocular adquirida há maior secreção de IL-1, TNF-α e IL-10 em resposta a antígenos de T.gondii quando comparados com indivíduos soropositivos sem lesão ocular. Estas informações nos sugerem, que a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões oculares está associada a mecanismos que culminam com a produção destas citocinas, as quais podem contribuir para o dano da retina e/ou da coróide. Mostrando assim, a participação de diferentes mecanismos no desenvolvimento das lesões oculares nos pacientes com lesão adquirida e congênita (YAMAMOTO *et al.,* 2000).

Em nosso estudo, o padrão IgG1 e IgG3 foi predominante nos indivíduos IgM^+ sem lesão e com lesão, por isso não é possível associar este padrão, supostamente Th1, como protetor à lesão ocular. A presença

destes isótipos na infecção recente, pode estar associada à atividade anti-parasitária via receptor Fc nos macrófagos, como uma tentativa do organismo para o controle da parasitemia. Estes isótipos podem também servir como marcadores auxiliares do diagnóstico da toxoplasmose adquirida e congênita.

Entre os pacientes com lesão grave e branda não houve diferença significativa na produção dos isótipos. Nestes grupos o IgG1 foi a subclasse predominante, com menor produção dos demais isótipos. GÓMEZ-MARÍN e colaboradores (2000) reportam que em casos de re-infecção pode haver produção dos isótipos IgM ou IgA anti- *T. gondii* separadamente ou em associação com o anticorpo IgE. IgA específica tem sido detectado também em casos de infecção recidiva ou em re-infecção, podendo ser encontrado em pacientes com infecção crônica (FORTIER *et al.,* 1997).

Em estudos anteriores mostrou-se uma relação funcional entre IgE e IgG4 em infecções em humanos (HUSSAIN e OTTESEN, 1986). Foi demonstrado em modelos animais que IgE anti- *T. gondii* poderia desempenhar função protetora na infecção pelo toxoplasma (RIDEL *et al.,* 1988). Em nosso estudo foi detectada a presença de IgE em apenas oito pacientes, sendo que dois destes produziram IgG4. Em termos de evolução clínica, um paciente desenvolveu lesão grave, dois apresentaram lesão branda e cinco não desenvolveram lesão ocular, em até três anos após o primeiro exame. Não foi possível correlacionar a produção de IgE com a proteção à lesão, pois o número de pacientes é muito pequeno. Por

outro lado, nossos dados mostram a presença deste anticorpo apenas em pacientes com infecção recente, pois não foi detectado IgE em nenhum paciente com infecção crônica.

Anticorpos IgE são detectáveis por ELISA no soro de adultos infectados, crianças com infecção congênita e crianças com retinocoroidite. A duração de soropositividade para IgE é menor do que IgM e IgA e, conseqüentemente, parece ser um método para identificar infecções recentes (PINON *et al.,* 1990). Interessante, é que embora tenhamos detectado a presença deste anticorpo, exclusivamente, em pacientes com infecção recente (IgA positiva e baixa avidez), observamos uma limitação técnica para a detecção deste anticorpo através da técnica ELISA, visto que em amostras confirmadamente positivas os resultados não foram reprodutivos em experimentos diferentes, provavelmente houve desnaturação protéica no processo de conservação das amostras. Diante disso, é importante ter certeza que a ausência deste isótipo seja realmente representativa de infecção tardia e não por limitação experimental (metodológica).

Avaliamos 67 pacientes com evidências sorológicas de toxoplasmose adquirida, dentre os quais 17 apresentavam lesão ocular no primeiro exame clínico (**Tabela II**). Entre os indivíduos com lesão ocular, 53% apresentaram lesão ocular branda e 47% evoluíram para a forma grave. Dentre os indivíduos que, inicialmente, não apresentavam lesão ocular, cerca de 80% destes não desenvolveram toxoplasmose ocular, em até três anos após o primeiro exame; 17% evoluíram para lesão branda e 8%

para lesão grave. Este grupo é raro entre as populações com toxoplasmose ocular já estudadas, por tratar-se de um grupo com confirmação sorológica e clínica para a toxoplasmose adquirida. Em Erechim a via adquirida se sobrepõe em importância clínica à via congênita (SILVEIRA *et al.,* 1988). A doença ocular aparece normalmente entre a segunda e quarta década de vida do paciente, isso se aplica tanto para a doença primária quanto a recorrente. A toxoplasmose se manifesta geralmente na fase aguda da infecção (IgM positivo), mas há relatos da ocorrência na fase crônica, em casos de infecção congênita e adquirida (HOLLAND *et al.,* 1996; MONTOYA *et al.,* 1996; BURNETT *et al.,* 1998).

Avaliamos a presença dos isótipos em relação à faixa etária e o sexo. Em relação a produção de IgA anti- *T. gondii*, entre os indivíduos que não têm toxoplasmose ocular, a maior produção de IgA está entre os pacientes na faixa de 10 a 20 anos de idade. Por outro lado, dentre os pacientes com toxoplasmose ocular, a detecção de IgA foi maior na faixa etária entre 41 e 50 anos.

Em um estudo numa população do Estado de Minas Gerais, na cidade de Melquíades, PORTELA e colaboradores (2004) também não encontraram correlação entre a presença de isótipos anti-*T. gondii* e a ocorrência de lesão ocular. Neste estudo, foi utilizado como antígeno o glicosilsinositol fosfolipídeo do taquizoíta (GIPL) que é uma forma antigênica diferente da utilizado em nossos experimentos. No trabalho deste grupo foi demonstrado que há correlação positiva entre a produção de IgA anti-GIPL e o tamanho da lesão ocular. Em nosso estudo

obtivemos resultados diferentes: do total de indivíduos produtores de IgA 85% não desenvolveram lesão ocular, 29% apresentaram lesão branda e 15% evoluiu para a lesão grave. Estas diferenças podem ser devido a diferença populacional, uma vez que estamos estudando uma região endêmica, cuja população pode estar sendo cronicamente re-infectada, pode ser que a produção deste isótipo esteja associada à resposta sistêmica na infecção e não ao dano ocular. Além disso, utilizamos diferentes formas antigênicas nos testes sorológicos e, ainda, pode ser que a população clonal do parasita seja diferente entre duas regiões do país.

Em um estudo recente sobre os fatores de risco associados à infecção pelo *T. gondii* em Erechim, JONES e colaboradores (2006) mostraram que o trabalho com o solo, seja no campo ou em jardinagem domiciliar, representa um importante fator de risco. Esta forma de infecção é muito importante nos indivíduos do sexo masculino. Neste mesmo estudo foi demonstrado que tanto crianças menores de 18 anos, quanto adultos do sexo masculino são mais vulneráveis à infecção (JONES *et al.,* 2006).

Embora a abordagem epidemiológica não seja o principal objeto do nosso estudo, tivemos a oportunidade de avaliar uma coorte de 272 indivíduos soropositivos para *T. gondii*, divididos em: 135 mulheres e 137 homens. Verificamos a freqüência da lesão ocular em relação ao sexo, idade e produção de IgA específica. Esta análise nos mostrou que 58% dos pacientes com lesão ocular são do sexo masculino e 62% dos

indivíduos sem lesão são do sexo feminino. Também observamos que a freqüência de indivíduos do sexo masculino soropositivo é maior entre crianças e adolescentes. Enquanto para as mulheres, está freqüência é maior acima dos 30 anos de idade. Apesar de não ter sido detectada diferença nas subclasses de IgG, verificamos que indivíduos do sexo masculino produzem mais IgA e IgE do que o sexo feminino (**Figura 4**). Entre os indivíduos com infecção recente (baixo índice de avidez), 78% eram do sexo masculino (dado não apresentado).

Embora em um estudo anterior tenha sido demonstrado que não há diferença na susceptibilidade à TO entre os sexos e que a prevalência da toxoplasmose ocular aumenta com a idade em Erechim (Silveira *et al*., 1988), Nossos dados corroboram com Jones e colaboradores (2006), sugerindo que indivíduos do sexo masculino para contraem a infecção mais precocemente e, consequentemente, desenvolvem a TO. Todavia, não observamos diferenças na resposta imune humoral em relação ao sexo. Outro importante estudo com indivíduos de Erechim mostrou que indivíduos com toxoplasmose adquirida desenvolvem lesões oculares tardiamente, em alguns casos anos após a primo-infecção (SILVEIRA *et al.,* 2001).

A literatura tradicionalmente descreveu que a toxoplasmose ocular raramente ocorre em casos de doença adquirida, baseado no fato de que o desenvolvimento da lesão ocular só seria possível simultaneamente ou logo após o aparecimento da doença sistêmica pós-infecção pelo *T. gondii* (NUSSENBLATT e BELFORT Jr., 1994; HOLLAND et al. 1996; HOLLAND *et*

al., 1999). Estes dados mostram que a população de Erechim apresenta peculiaridades em relação à toxoplasmose, que podem ser relacionados com características epidemiológicas, ambientais, individuais e, sobretudo, com a genética do parasita.

Embora seja controversa a participação dos anticorpos na resistência à infecção pelo Toxoplasma, modelos experimentais em camundongos, ratos e cobaias têm produzido diferentes resultados a respeito do potencial protetor dos anticorpos anti-*T. gondii* que pode variar devido ao basal genético dos hospedeiros e/ou do parasita. A proteção à infecção foi demonstrada pela transferência passiva do soro imune ou de anticorpos monoclonais específicos a proteínas do *T.gondii* para camundongos infectados com cepas de virulência moderada (MASIHI e WERNER, 1978; JOHNSON, MCDONALD e NEOH, 1983; SHARMA *et al.,* 1984). Além disso, a supressão da produção de anticorpos, através do tratamento com anticorpos anti-μ, resultou na exacerbação da infecção e a transferência passiva de soro de camundongos cronicamente infectados para camundongos deficientes de células B recuperou metade dos animais infectados (FRENKEL e TAYLOR, 1982).

O melhor entendimento da correlação entre a produção de determinado isótipo e a manifestação clínica, pode servir como diagnóstico, e também como prognóstico da Toxoplasmose ocular. Este estudo também pode contribuir para o entendimento da resposta imune humoral na infecção em seres humanos envolvidas na infecção dos indivíduos com toxoplasmose ocular. Diante da dificuldade em definir uma

infecção adquirida recente, a pesquisa de subclasses de IgG nesta população sugere a dinâmica da resposta imune humoral em indivíduos com infecção adquirida recente e crônica. Portanto, a pesquisa destes isótipos pode ser mais um parâmetro sorológico para a caracterização de infecção recente em indivíduos imunocompetentes.

O desencadeamento da doença ocular com maior ou menor gravidade, parece depender de três aspectos fundamentais diretamente ligados à infecção, que são: as características do hospedeiro, com especial importância para a resposta imune; do meio-ambiente, que pode contribuir para a disseminação do parasita; e por fim, a virulência da cepa infectante, que parece estar relacionada à patogenicidade. O nosso próximo objetivo, foi estabelecer a relação entre a cepa infectante e as manifestações clínicas da toxoplasmose ocular. Para isso utilizamos teste sorológico para definir o sorotipo da cepa do *T. gondii*, baseada no fato de que a resposta imune ao parasita é cepa-específica (PARMLEY *et al.,* 1994).

Avaliamos pelo método ELISA a presença de anticorpos em amostras de soro de 249 indivíduos soropositivos, provenientes de Erechim, contra peptídeos polimórficos recombinantes de regiões altamente imunogênicas do parasita (proteínas GRA6 e GRA7), os quais são capazes de diferenciar entre a linhagem II das linhagens I e III (KONG *et al.,* 2003).

A tipagem sorológica de cepas é possível devido a pequena variação entre as três linhagens clonais do *T. gondii*. Estudos desta natureza permitem uma avaliação retrospectiva sobre a dinâmica da infecção em

populações de áreas endêmicas e em casos específicos de surtos, pois a técnica é capaz de detectar a resposta contra os peptídeos recombinantes tanto em pacientes agudos, quanto em pacientes crônicos (Kong *et al.,* 2003).

Neste estudo caracterizamos sorotipos do *T. gondii* que infectam pacientes de Erechim e associamos à forma clínica da doença. Nossos dados claramente mostram que há uma diversidade das cepas infectantes nesta população. Diante do fato de que foi detectado um número significativo de pacientes infectados com os sorotipos I/III ou II. Naturalmente, isto sugere que a resposta imune destes indivíduos não é diferente dos norte-americanos e europeus, nos quais o tipo II está associado com a maioria dos casos de toxoplasmose ocular (HOWE e SIBLEY, 1995; HOWE *et al*., 1997; HONORÉ *et al.,* 2000; FUENTES *et al*., 2001). Ademais, caracterização genotípica em amostras de pacientes de Erechim sugeriu a presença de cepas do Tipo I (VALLOCHI *et al.,* 2005a).

Em contrapartida, nós também observamos sorotipos atípicos, os quais não haviam sido detectados em estudos semelhantes com amostras da Polônia - Europa (NOWAKOWSKA *et al*., 2006) e Colômbia - América do Sul (PEYRON *et al*., 2006). Detectamos anticorpos contra peptídeos específicos tanto para tipo I/III quanto para o tipo II, sugerindo a presença de cepas divergentes (isto é, apresentam alelos polimórficos em outras regiões que não os presentes nos peptídeos recombinantes do GRA6 e GRA7) ou cepas mistas. Coincidentemente, recente estudo de genotipagem de amostras de suínos coletadas em pocilgas e abatedouros

de Erechim detectou genótipos mistos ou divergentes – tipo I/III ou tipo I/II/III – nas amostras analisadas (BELFORT-NETO *et al.*, 2007).

Um dos resultados mais surpreendentes deste trabalho, é exatamente mostrar que há um grande número de pacientes infectados, mas que não respondem contra qualquer um dos peptídeos cepa-específicos (Atípico D) e que a maioria deles apresenta a forma grave da doença ocular. Este é primeiro estudo de clara associação entre os sorotipos do parasita e a manifestação clínica da toxoplasmose ocular.

A presença de variações sorotípicas do *T. gondii* na população de Erechim e esta associação de uma destas cepas com a TO grave, nós sugere que estas cepas geneticamente divergentes dos padrões previamente descritos tenham maior tropismo para a retina e, por isso, a elevada incidência da TO. Diante da elevada endemicidade para esta infecção em Erechim, é possível que a variabilidade genética seja conseqüente de recombinações sexuais no ciclo de vida do parasita, como já foi sugerido para outras partes do Brasil (FERREIRA *et al.*, 2006).

Um paciente (#20) incluído neste estudo, apresentou sorologia positiva (IgM-/IgG+) para T.gondii ao primeiro exame, mas não apresentou toxoplasmose ocular. Depois de dois anos, o referido paciente retornou a Clínica Silveira com quadro de toxoplasmose sistêmica e, neste momento, foi detectada a presença de anticorpo IgM, sugerindo a reativação da doença. Infelizmente não tivemos acesso ao soro deste paciente na primeira amostra, mas na segunda amostra detectamos um sorotipo sugestivo de uma cepa mista (Atípico C). O que sugere que esta

paciente tenha sido infectada por diferentes cepas, fato que pode ser justificado pela alta taxa de carnes de suínos infectadas com cepas atípicas em Erechim (BELFORT-NETO *et al*., 2007).

Avaliamos a relação entre a produção das subclasses de IgG e o sorotipo do *T.gondii* com o objetivo de verificarmos se diferentes cepas seriam capazes de estimular diferenças na resposta imune humoral. Observamos diferenças na produção de isótipos para cada sorotipo, sendo que a produção de IgG3 foi significativamente maior nos sorotipos I/III e Atípico A. Apenas IgG1 foi detectada nas amostras dos indivíduos infectados com o sorotipo Atípico D. O dado não foi apresentado, pois a pesquisa de subclasses foi feita com o STAg e não com peptídeos cepa-específicos, mesmo assim, os dados são sugestivos de que diferenças na resposta imune podem ser observadas na infecção por diferentes cepas e, este poderia ser um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento ou proteção à doença.

A validação dos nossos dados foi feita com a análise de amostras dos mesmos indivíduos em diferentes coletas. Conforme apresentamos na **Tabela 6**, avaliamos a presença de anticorpos cepa-específicos no soro de alguns pacientes com intervalos de meses ou anos e o sorotipo detectado permanece o mesmo. Estes dados foram fundamentais para sabermos se a ausência de reatividade frente aos peptídeos do GRA6 e GRA7 seria devida má qualidade da amostra, dos peptídeos ou por falta de especificidade dos peptídeos. A detecção do mesmo padrão de resposta em ambas as amostras do mesmo paciente, sugere que não há

reconhecimento antígeno-específico pelos anticorpos do paciente frente aos peptídeos. Paralelamente, as amostras com diversos padrões de resposta, incluindo as supostamente não respondedoras e aquelas com forte reatividade, foram testadas pela mesma metodologia em diluições seriadas (1:40 até 1:640) e os resultados foram reproduzidos (dado não mostrado). Desta maneira, descartamos a possibilidade de resultados falso-positivos ou negativos.

Duas amostras avaliadas neste estudo para sorotipagem foram também avaliadas em outro estudo para genotipagem (KHAN *et al.,* 2006). Em nossos resultados, a sorotipagem sugere a presença da infecção com cepas atípicas. KHAN e colaboradores (2006) também detectaram cepas atípicas como responsáveis pela infecção em ambos os lugares. Correlacionamos as amostras analisadas na genotipagem e àquelas analisadas em nosso estudo. Segunda a classificação da Clínica Silveira, as amostras 413 e 418, correspondem respectivamente aos números 2644 e 2712 analisadas genotipicamente. Amostra em que detectamos o sorotipo Atípico A, foi detectado um genótipo misto tipo I, II e III, enquanto na amostra que detectamos o Atípico B, foi detectado um genótipo misto, porém diferente do anterior, definido como tipo I e II.

Tanto em nossos resultados quanto naqueles apresentados por KHAN e colaboradores (2006), fica claro que há uma diversidade genética na cepa que infecta indivíduos de Erechim e em outras partes do Brasil. De fato, tanto a sorotipagem quanto à genotipagem das cepas são

técnicas que devem ser utilizadas para complementação de resultados. A primeira, pela facilidade de acesso ao material biológico e sensibilidade e, a segunda, pela possibilidade de caracterização mais completa do genótipo da cepa, aliando-se, inclusive, o seqüenciamento para determinação de regiões polimórficas, possivelmente relacionadas à virulência.

Em modelos murinos as cepas tipo I estão associadas às formas graves de doença (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992). A virulência é, em parte, resultado da diferenciada capacidade de migração do parasita, através das barreiras fisiológicas no hospedeiro, fato que possibilita a rápida disseminação e aumento da carga parasitária na infecção (BARRAGAN e SIBLEY, 2002), quando, finalmente, libera a cascata de mediadores pro - inflamatórios que induzem a patologia (GRAVRILESCU e DENKERS, 2001). Em isolados de pacientes de Erechim, foi detectada a presença da cepa Tipo I (VALLOCHI *et al.,* 2005), porém neste estudo não foi feita a associação com a gravidade da doença.

Outra parte dos nossos pacientes apresentou a forma grave da toxoplasmose, mas não desenvolveram lesão ocular em até três anos após a primeira infecção. Estes pacientes apresentaram quadros com febre alta e persistente, linfadenopatia, dor de cabeça. Curiosamente, quase 40% destes pacientes estavam infectados pela cepa tipo II. Nossos dados são bastante sugestivos de que, em contraste com o que ocorre na Europa e Estados Unidos (HOWE *et al*., 1997; FUENTES *et al*., 2001; HONORÉ

et al., 2000), a cepa tipo II não é a linhagem responsável pela toxoplasmose ocular em Erechim.

Entre os pacientes do grupo IgM^+ que foram seguidos clinicamente, não foi encontrada associação entre a produção dos isótipos e a evolução da toxoplasmose, contudo nós observamos que 60% dos indivíduos que evoluíram para a forma grave da doença ocular estavam infectados pelo sorotipo D. Curiosamente, o sorotipo I/III foi detectado em 45% dos pacientes que não desenvolveram doença ocular e não foi detectado nos pacientes com TO grave. Em conjunto com as nossas observações anteriores, estes dados sugerem que há correlação entre os sorotipos e desenvolvimento da doença ocular. Sugerindo que o sorotipo I/III parece estar relacionado com menor possibilidade para o desenvolvimento da lesão, enquanto o Atípico D, fortemente associado à forma grave da doença ocular.

O estudo da imunidade humoral em pacientes com TO nos mostra que não há um padrão de isótipos associado ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular, porém sugere que a presença de IgG2 e IgG3, além de IgA e IgE, podem estar associadas com infecção adquirida recente. Nossos dados também mostram que há uma grande diversidade de cepas, com diferentes formas de virulência, parasitando a população de Erechim e outras partes do Brasil. A utilização dos peptídeos cepa-específicos nas investigações sorológicas, além de sugerir aspectos da cepa do parasita, parece ser útil como um marcador para estabelecermos o prognóstico

para a evolução da TO, servindo como referência para nortear o clínico nas condutas terapêuticas em benefício do paciente.

Nossos dados são importantes também por re-inserirem as características da resposta imune nos fatores responsáveis pela susceptibilidade ao aparecimento de TO. Desde que nós demonstramos que as cepas responsáveis por grande parte das infecções oculares no Brasil apresentavam um padrão genético diferente daquele descrito no Hemisfério Norte, a discussão sobre o aparecimento de TO ficou centrada exclusivamente em aspectos do parasita. Os dados aqui apresentados, mostram que a resposta imune contra estes parasitas "atípicos" geneticamente é centrada em epitopos diferentes daqueles que observamos em resposta aos parasitas que se encontram dentro dos padrões quase clonais das 3 famílias descritas na literatura. Sendo assim, passa a ser pertinente a discussão se, alem da diferença genética entre as cepas ser responsável por maior óculo-tropismo das mesmas, ela também parece resultar em uma resposta imune para diferentes alvos, podendo desta maneira contribuir para a maior freqüência de lesões oculares, seja por resultar em uma resposta não protetora, seja por selecionar cepas que escapem para o ambiente altamente imuno-privilegiado do olho.

6. Conclusão

Nossos resultados sugerem:

- IgG1 é a subclasse envolvida na resposta imune ao T. gondii em indivíduos com infecção aguda e crônica;

- IgG1 e IgG3 parecem estar associados à infecção adquirida recente;

- IgA e IgE estão presentes na infecção aguda;

- Diferentes cepas do T. gondii são responsáveis pela toxoplasmose na população de Erechim;

- A gravidade da toxoplasmose ocular em Erechim parece ser dependente da cepa infectante, sendo o sorotipo I/III, relacionado à lesão ocular branda, um novo sorotipo - Atípico D, associado com a forma grave da toxoplasmose ocular;

- Investigações sorológicos com peptídeos cepa-específicos (GRA-6 e GRA-7) do *T. gondii* podem ser utilizadas tanto para a caracterização das cepas do parasita, quanto para o estabelecimento do prognóstico da toxoplasmose ocular.

AALBERSE, RC; VAN DER GAAG, R; VAN LEEUWEN J. Serologic aspects of IgG4 - restricted response. **J. Immunol**. v. 130, p. 722-726, 1983.

ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; POBER, JS. **Imunologia Celular e Molecular**, 4ªed., Rio de Janeiro, Ed. Revinter, p. 41-60/309-333, 2003.

AIKAWA, M; KOMATA, Y; ASAI, T; MIDORIKAWA, O. Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. **Am J Pathol.** v. 87, p. 285-296, 1977.

Ajioka, JW; Boothroyd, JC; Brunk, BP; Hehl, A; Hillier, L; Manger, ID; Marra, M; Overton, GC; Roos, DS; Wan, KL; Waterston, R; Sibley, LD. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. **Genome Res**. v. 8, p. 18-28, 1998.

AJZENBERG, D; BANULS, AL; TIBAYRENC, M; DARDE, ML; Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **Int J Parasitol**. v.32, p. 27–38, 2002A.

AJZENBERG, D; COGNÉ N; PARIS L; BESSIERES MH; THULLIEZ P; FILLISETTI D; PELLOUX H; MARTY P; DARDÉ ML; Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. **J. Infect. Dis**. v.186, p. 684-689, 2002B.

AJZENBERG, D; BANULS, AL; SU, C; DUMETRE, A; DEMAR, M; CARME, B; DARDÉ, ML. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**. v.34, p. 1185-1196. 2004.

ALIBERTI J, REIS E SOUSA C, SCHITO M, HIENY S, WELLS T, HUFFNAGLE GB, SHER A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. **Nat Immunol**. v. 1, p 83-77, 2000.

ANDERSEN, LP; GAARSLEV, K. IgG subclass antibodies against *Helicobacter pylori* heat-stabile antigens in normal persons and dyspeptic patients. **APMIS**. v. 100, p. 747–751, 1992.

ASAI, T; MIZUNO, F; KOJIMA, S; TAKEUCHI, T; KOBAYASHI, A; SUZUKI, EY. High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and an enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microbiol.** v. 30, p. 1291-1293, 1992.

ASHBEE, HR; MUIR, SR; CUNLIFFE, WJ; INGHAM, E. IgG suclasses specific to *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* in patients with acne vulgaris. **Br J Dermatol**. v. 136, p. 730–733, 1997.

ASHBURN, D; DAVIDSON, MM; JOSS, AW; PENNINGTON, TH; HO-YEN, DO. Improved diagnosis of reactivated toxoplasmosis. **Mol Pathol**. v. 51, p. 105-109, 1998.

BAHIA-OLIVEIRA, LM; JONES, JL; AZEVEDO-SILVA, J; ALVES, CC; OREFICE, F; ADDISS, DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerg Infect Dis**. v. 9, p. 55-62, 2003.

BARRAGAN, A; SIBLEY, LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **J Exp Med**. v. 195, p. 1625-1633, 2002.

BELFORT-NETO, R; NUSSENBLATT, V; RIZZO, L; MUCCIOLI, C; SILVEIRA, C; NUSSENBLATT, R; KHAN, A; SIBLEY, LD; BELFORT, R JR. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. **An Acad Bras Cienc**. v. 79, p. 111-114, 2007.

BERGER, BB; EGWUAGU, CE; FREEMAN, WR; WILEY, CA; MILIAR, Y. Toxoplasmic Retinitis in acquired immunodeficiency syndrome. **Arch Ophthamol**. v. 111, p. 373-376, 1993.

BERTOZZI, LC; SUZUKI, LA; ROSSI, CL. Serological diagnosis of Toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii.***Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 41, p. 175-177, 1999.

BESSIERES, MH; ROQUES, C; BERREBI, A; BARRE, V; CAZAUX, M; SEGUELA, JP. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. **Clin Pathol**. v. 45, p. 605–608, 1992.

BJORKANDER, J; BENGTSSON, U; OXELIUS, VA; HANSON, LA. Symptoms in patients with lowered levels of IgG subclasses, with or without IgA deficiency, and effects of immunoglobulin prophylaxis. **Monogr Allergy**. v. 20, p. 157–163, 1986.

BLISS, SK; BUTCHER BA; DENKERS, EY. Rapid recruitment of neutrophils containing pre-stored IL-12 during microbial infection, **J Immunol**. v. 165, p. 4515–4521, 2000.

BLISS, SK; GAVRILESCU, LC; ALCARAZ, A; DENKERS, EY. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infect Immun**. v. 69, p. 4898-4905, 2001.

BLOCH-MICHEL E, LAMBIN P, DEBBIA M, TOUNSI Y, TRICHET C, OFFRET H. Local roduction of IgG and IgG subclasses in the aqueous humor of patients with Fuchs heterochromic cyclitis, herpetic uveitis and toxoplasmic chorioretinitis. **Int Ophthalmol**. V. 21, p. 187-194, 1998.

BONAMETTI, AM; PASSOS, JN; KOGA DA SILVA, EM; MACEDO, ZS. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. **J Trop Pediatr**. v. 43, p. 116, 1997.

BOOTHROYD, JC; GRIGG, ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Curr Opin Microbiol.** v. 5, p. 438-442, 2002.

BOSCH-DRIESSEN, LH; VERBRAAK, FD; SUTTORP-SCHULTEN, MS; VAN RUYVEN, RL; KLOK, AM; HOYNG, CB; ROTHOVA, A. A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol**. v. 134, p. 34-40, 2002.

BOYLE, JP; SAEIJ, JP; CLEARY, MD; BOOTHROYD, JC. Analysis of gene expression during development: lessons from the Apicomplexa. **Microbes Infect**. v. 8, p. 1623-1630, 2006.

BRANDAO, GP; FERREIRA, AM; MELO, MN; VITOR, RW. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite.** v. 13, p. 143-149, 2006.

BRUYNZEEL, PLB; BERRENS, L. IgE and IgG4 antibodies in specific human allergies. **Int Arch Allergy Appl Immunol**. v. 58, p. 344-350, 1979.

Buffolano, W; Beghetto, E; Del Pezzo, M; Spadoni, A; Di Cristina, M; Petersen, E; Gargano, N. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**. v. 43, p. 5916-5924, 2005.

BURNETT, AJ; SHORTT, SG; ISAAC-RENTON, J; KING, A; WERKER, D; BOWIE, WR. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. **Ophthalmology.** v. 105(6), p. 1032-1037, 1998.

BUTCHER, BA; DENKERS, EY. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. **Infect Immun**. v. 70(9), p. 5216-5224. 2002.

COCHEREAU-MASSIN, I; LE HOANG, P; LAUTIER-FRAU, M; ZAZOUN, L; MARCEL, P; ROBINET, M; BESINGUE, A; ROUSSELIE, F. Cytomegalovirus retinitis in AIDS. Treatment with intravitreal injections of ganciclovir. **Presse Med**. v. 19(28), p. 1313-1316, 1990.

DA SILVA, AV; PEZERICO, SB; DE LIMA, VY; D'ARC MORETTI, L; PINHEIRO, JP; TANAKA, EM; RIBEIRO, MG; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. **Vet Parasitol**. v. 127(1), p. 23-27, 2005.

DANNEMANN, BR; VAUGHAN, WC; THULLIEZ, P; REMINGTON, JS. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microbiol**. v. 28, p. 1928–1933, 1990.

DARDE, ML; BOUTEILLE, B; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **J Parasitol.** v. 78, p. 786-794, 1992.

DARDE, ML. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 219, p. 2741, 1996.

DARDE, ML; VILLENA, I; PINON, JM; BEGUINOT, I. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. **J Clin Microbiol.** v. 36(1), p. 324, 1998.

DE MOURA, L; BAHIA-OLIVEIRA, LM; WADA, MY; JONES, JL; TUBOI, SH; CARMO, EH; RAMALHO, WM; CAMARGO, NJ; TREVISAN, R; GRACA, RM; DA SILVA, AJ; MOURA, I; DUBEY, JP; GARRETT, DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerg Infect Dis**. v. 12(2), p. 326-329, 2006.

DECOSTER, A; SLIZEWICS, B; SIMON, J; BAZIN, C; DARCY, F; VITTU, G; BOULANGER, C; CHAMPEAU, Y; DEMORY, JL; DUHAMEL, M; CAPRON, A. Platelia Toxo IgA, a new kit for early diagnosis of congenital toxoplasmosis by detection of anti-P30 immunoglobulin A antibodies. **J Clin Microbiol**. v. 29, p. 2291–2295, 1991.

DENKERS, EY; GAZZINELLI, RT; HIENY, S; CASPAR, P; SHER, A. Bone marrow macrophages process exogenous *Toxoplasma gondii* polypeptides for recognition by parasite-specific cytolytic T lymphocytes. **J Immunol**. v. 150(2), p. 517-526, 1993.

DENKERS, EY; SHER, A; GAZZINELLI, RT. CD8+ T-cell interactions with *Toxoplasma gondii*, implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. **Res Immunol**. v. 144(1), p. 51-57, 1993.

DENKERS, EY; CASPAR, P; SHER, A. *Toxoplasma gondii* possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor V beta 5 chain of the mouse T cell receptor. **J Immunol**. v. 180; p. 985-994, 1994.

DENKERS, EY; GAZZINELLI, RT. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin Microbiol Rev**. v. 11, p. 569-588, 1998.

DENKERS, EY. From cells to signaling cascades, manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **Immunology and Medical Microbiology**. v. 39; p. 193-220, 2003.

DESMONTS, G. Definitive serological diagnosis of ocular toxoplasmosis. **Arch Ophthalmol**. v. 76, p. 839-851, 1966.

DESMONTS, G. Some remarks on the immunopathology of toxoplasmic uveitis. **Mod Probl Ophthalmol**. v. 16, p. 228-232, 1976.

DETRICK, BD; NEWSOME, D; PERCOPO, C; HOOKS, JJ. Class II antigen expression and gamma interferon modulation of monocytes and retinal pigment epithelial cells from patients with retinitis pigmentosa. **Clin Immunol Immunopathol**. v. 36, p. 201–211, 1985.

DOBROWOLSKI, JM; SIBLEY, LD. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**. v. 84(6), p. 933-939, 1996.

DOFT, BH; GASS, DM. Punctate outer retinal toxoplasmosis. **Arch Ophthalmol**. v. 103(9), p. 1332-1336, 1985.

DUBEY, JP; MILLER, NL; FRENKEL, JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. **J Am Vet Med Assoc**. v. 157(11), p. 1767-1770, 1970.

DUBEY, JP. Toxoplasmosis. **J Am Vet Med Assoc**. v. 189(2), p. 166-170, 1986.

DUBEY, JP; BEATTIE, CP. Toxoplasmosis of animals and man. Florida: Boca Raton: **CRC Press.** p.55, 1988.

DUBEY, JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with T gondii oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **Am J Vet Res**. v. 49(6), p. 910-913, 1988.

DUBEY, JP; LINDSAY, DS; SPEER, CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev**. v. 11(2), p. 267-299, 1998.

DUBEY, JP. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. **J Parasitol**. v. 84(6), p. 1279-1282, 1998.

DUBEY, JP. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **J Parasitol**. v. 88(4), p. 713-717, 2002.

DUBEY, JP; GRAHAM, DH; BLACKSTON, CR; LEHMANN, T; GENNARI, SM; RAGOZO, AM; NISHI, SM; SHEN, SK; KWOK, OC; HILL, DE; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (Gallus domesticus) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **Int J Parasitol**. v. 32(1), p. 99-105, 2002.

DUBEY, JP; GRAHAM, DH; DA SILVA, DS; LEHMANN, T; BAHIA-OLIVEIRA, LM. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **J Parasitol**. v. 89(4), p. 851-853, 2003.

DUBEY, JP; NAVARRO, IT; GRAHAM, DH; DAHL, E; FREIRE, RL; PRUDENCIO, LB; SREEKUMAR C; VIANNA, MC; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. **Vet Parasitol**. v. 117(3), p. 229-234, 2003.

DUBEY, JP; NAVARRO, IT; SREEKUMAR, C; DAHL, E; FREIRE, RL; KAWABATA, HH; VIANNA, MC; KWOK, OC; SHEN, SK; THULLIEZ, P; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **J Parasitol**. v. 90(4), p. 721-726, 2004.

DUBEY, JP; GOMEZ-MARIN, JE; BEDOYA, A; LORA, F; VIANNA, MC; HILL, D; KWOK, OC; SHEN, SK; MARCET, PL; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Vet Parasitol**. v. 134, p. 67-72, 2005.

DUBEY, JP; GENNARI, SM; LABRUNA, MB; CAMARGO, LM; VIANNA, MC; MARCET, PL; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **J Parasitol**. v. 92(1), p. 36-40, 2006.

DUBEY, JP; GRAHAM, DH; DA SILVA, DS; LEHMANN, T; BAHIA-OLIVEIRA, LM. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, **Emerg Infect Dis**. v. 12(4), p. 582-587, 2006.

DUBEY, JP; SUNDAR, N; GENNARI, SM; MINERVINO, AH; FARIAS, NA; RUAS, JL; DOS SANTOS, TR; CAVALCANTE, GT; KWOK, OC; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Vet Parasitol.** v. 142, p. 47-53, 2006

ELNER, VM; STRIETER, RM; ELNER, SG; BAGGIOLINI, M; LINDLEY, I; KUNKEL, SL. Neutrophil chemotactic factor (IL-8) gene expression by cytokine- treated retinal pigment epithelial cells. **Am. J. Pathol**. v. 136, p. 745–750, 1990.

FAZAELI, A; CARTER, PE; DARDE, ML; PENNINGTON, TH. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. **Int J Parasitol**. v. 30(5), p. 637-642, 2000.

FERREIRA, AM; VITOR RW; CARNEIRO, AC; BRANDAO, GP; MELO, MN. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). **Infect Genet Evol**. v. 4(2), p. 131-142, 2004.

FERREIRA, AM; VITOR, RW; GAZZINELLI, RT; MELO, MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infect Genet Evol.** v. 6(1), p. 22-31, 2006.

FORTIER, B; COIGNARD-CHATAIN, C; DAO, A; ROULAND, V; VALAT, AS; VINATIER, D; LEBRUN, T. Study of developing clinical outbreak and serological rebounds in children with congenital toxoplasmosis and follow-up during the first 2 years of life. **Arch Pediatr**. v. 4, p. 940-946, 1997.

FOSTER, BG; MCCULLOCH, WF. Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*. **Can J Microbiol.** v. 14, p. 103-110, 1968.

FOULON, W; VILLENA, I; STRAY-PEDERSEN, B; *et al.* Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. **Am J Obstet Gynecol.** v. 180, p. 410-415, 1999.

FRENKEL, JK. Pathogenesis of toxoplasma with a consideration of cyst rupture in besnoitia infection. **Surv. Ophthalmol**..v. 6, p. 799-825, 1961.

FRENKEL, JK; DUBEY, JP. Effects of freezing on the viability of toxoplasma oocysts. **J Parasitol**. v. 59(3), p. 587-588, 1973.

FRENKEL, JK; TAYLOR, DW. Toxoplasmosis in immunoglobulin M-suppressed mice. **Infect Immun**. v. 38, p. 360-367, 1982.

FRENKEL, JK. Toxoplasmosis in human beings. **J Am Vet Med Assoc**. v. 196(2), p. 240-248, 1990.

FRENKEL, JK; PFEFFERKORN, ER; SMITH, DD; FISHBACK, JL. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **Am J Vet Res**. v. 52(5), p. 759-63, 1991.

FRIEDMANN, CT; KNOX, DL. Variations in recurrent active toxoplasmic retinochoroiditis **Arch Ophthalmol**. v. 81(4), p. 481-493, 1969.

FUENTES, I; RUBIO, JM; RAMIREZ, C; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **J Clin Microbiol**. v. 39(4), p. 1566-1570, 2001.

FUX, B; RODRIGUES, CV; PORTELA, RW; SILVA, NM; SU, C; SIBLEY, D; VITOR, RW; GAZZINELLI, RT. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.** v. 71, p. 6392-6401, 2003.

GARCIA, JL; NAVARRO, IT; OGAWA, L; OLIVEIRA, RC; GARCIA, SMF; LEITE, J. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela Tela de Amslerr, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. **Rev Inst Med Trop.** v.45, p. 147-151, 2003.

GASCAN, H; GAUCHAT, JF; RONCAROLO, MG; YSSEL, H; SPITS, H; DE VRIES, JE. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. **J Exp Med**. v. 173, p. 747-750, 1991.

GAVRILESCU, LC; DENKERS, EY. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. **J Immunol**. v. 167, p. 902-909, 2001.

GAZZINELLI, RT; HAKIM, FT; HIENY, S; SHEARER, GM; SHER A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J Immunol**. v. 1;146, p. 286-292, 1991.

GAZZINELLI, R; XU, Y; HIENY, S; CHEEVER, A; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**. v. 149, p. 175-180, 1992.

GAZZINELLI, RT; DENKERS, EY; SHER, A. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. **Infect Agents Dis**. v. 2, p. 139-149, 1993.

GAZZINELLI, RT; BREZIN, A; LI, Q; NUSSENBLATT, RB; CHAN, CC. *Toxoplasma gondi.* Aquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-α and IFN-γ. **Exp Parasitol.** v. 78, p. 217–229, 1994.

GIAMMANCO, A; TAORMINA, S; CHIARINI, A; DARDANONI, G; STEFANELLI, P; SALMASO, S; MASTRANTONIO, P. Analogous IgG subclass response to pertussis toxin in vaccinated children, healthy or affected by whooping cough. **Vaccine**. v. 16, p. 1924-1931, 2003.

GILBERT, RE; STANFORD, MR. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? **Br J Ophthalmol**. v. 84, p. 224-226, 2000.

GLASNER, PD; SILVEIRA, C; KRUSZON-MORAN, D; MARTINS, MC; BURNIER, M; SILVEIRA, JR; CAMARGO, ME; NUSSENBLATT, RB; KASLOW, RA; BELFORT, R. JR. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **Am J ophthalmol**. v.114, p. 136-144, 1992.

GOMEZ-MARIN, JE; MONTOYA-DE-LONDONO, MT; CASTANO-OSORIO, JC; HEINE, FA; DUQUE, AM; CHEMLA, C; AUBERT, D; BONHOMME, A; PINON, JM. Frequency of specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in Colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 95, p. 89-94, 2000.

GREINER, M; SOHR, D; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**. v. 185, p. 123-132, 1995.

GRIGG, ME; BOOTHROYD, JC. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCRrestriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. **J Clin Microbiol.** v. 39, p. 398-400, 2001a.

GRIGG, ME; GANATRA, J; BOOTHROYD, JC; Margolis, TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **J Infect Dis**. v. 184, p. 63-69, 2001b.

GROSS, U; HOLPERT, M; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Ann Ist Super Sanita**. v. 40, p. 65-70, 2004.

GWYNN, CM; ALMOSAWI, T; STANWORTH, DR. Clinical associations with serum allergen-specific IgG4 antibodies. **Clin. Allergy.** v. 12, p. 459-464, 1982.

HALL, AV; JOHNSON, JD; STEVENS, PJ; RENTON, NE; HOLLIMAN, RE. Measurement of Toxoplasma IgM by a microparticle capture enzyme immuno-assay. **J Med Microbiol**. v. 38, p. 34-37, 1993.

HANDMAN, E; REMINGTON, JS. Antibody responses to toxoplasma antigens in mice infected with strains of different virulence. **Infect Immun**. v. 29, p. 215-220, 1980.

HANLEY, JA; McNEIL, BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. **Radiology.** v. 143, p. 29-36, 1982.

HAUSMANN, EH; HAO, SY; PACE, JL; PARMELY, MJ. Transforming growth factor beta 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. **Infect Immun**. v. 62, p. 3625-3632, 1994.

HAYDE, M; SALZER, HR; GITTLER, G; ASPOCK, H; POLLAK, A. Microparticle enzyme immunoassay (MEIA) for toxoplasma specific immunoglobulin G in comparison to the Sabin-Feldman dye test. A pilot study. **Wien Klin Wochenschr**. v. 107, p. 133-136, 1995.

HEDMAN, K; LAPPALAINEN, M; SEPPAIA, I; MAKELA, O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J Infect Dis**. v. 159, p. 736-740, 1989.

HEINZEL, FP; SADICK, MD; HOLADAY, BJ; COFFMAN, RL; LOCKSLEY, RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J Exp Med**. v. 169, p. 59-72, 1989.

HERROD, HG. Management of the patient with IgG subclass deficiency and/or selective antibody deficiency. **Ann Allergy**. v. 70, p. 3-8, 1993.

HIRAI, K; HIRATO, K; YANAGAWA, R. A cinematographic study of the penetration of cultured cells by *Toxoplasma gondii*. **Jpn J Vet Res**. v. 14, p. 81-90, 1966.

HOLLAND, GN; ENGSTROM, RE JR; GLASGOW, BJ; BERGER, BB; DANIELS, SA; SIDIKARO, Y; HARMON, JA; FISCHER, DH; BOYER, DS; RAO, NA; et al. Ocular toxoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Am J Ophthalmol**. v. 106, p. 653-667, 1988.

HOLLAND, GN. Ocular toxoplasmosis in the immunocompromised host. **Int Ophthalmol**. v. 13, p. 399-402, 1989.

HOLLAND, GN; O'CONNOR, GR; BELFORT, JR; REMINGTON, JS. Toxoplasmosis. In PEPOSE, JS; HOLLAND, GN; WILHELMUS, KR. editors. **Ocular Infection & Immunity**. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc. p. 1183-1223. 1996.

HOLLAND, GN. New issues in the management of patients with AIDS-related cytomegalovirus retinitis. **Arch Ophthalmol**. v. 118, p. 704-706, 2000.

HOLLAND, GN; LEWIS, KG. An update on current practices in the management of ocular toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol**. v. 134, p. 102-114, 2002.

HOLLAND, GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **Am J Ophthalmol**, v. 136, p.973-988, 2003.

HOLLAND, GN. Ocular toxoplasmosis, a global reassessment. Part II: disease manifestation sand management. **Am J Ophthalmol**. v. 137, p. 1-17, 2004.

HOLLIMAN, RE; RAYMOND, R; RENTON, N; JOHNSON, JD. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidemiol Infect**. v. 112, p.399-408, 1994.

HONORE, S; COUVELARD, A; GARIN, YJ; BEDEL, C; HENIN, D; DARDE, ML; DEROUIN, F. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients. **Pathol Biol**. v. 48, p. 541-547, 2000.

HOWE, DK; SIBLEY, LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages, correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis**. v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HOWE, DK; SUMMERS, BC; SIBLEY, LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**. v. 64, p. 5193-5198, 1996.

HOWE, DK; HONORE, S; DEROUIN, F; SIBLEY, LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J Clin Microbiol.** v. 35, p. 1411-1414, 1997.

HUNTER, CA; REMINGTON, JS. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. **J Infect Dis**. v. 170, p. 1057, 1994.

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**. v. 27, p. 2031-2038, 1989.

HUSSAIN, R; OTTESEN, EA. IgE responses in human filariasis. IV. Parallel antigen recognition by IgE and IgG4 subclass antibodies. **J Immunol**. v. 136, p. 1859-1863, 1986.

HUSSAIN, R; KIFAYET, A; CHIANG, TJ. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. **Infect Immun**. v. 63, p. 410–415, 1995.

ISKANDER, R; DAS, PK; AALBERSE, RC. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. Int. **Arch.Allergy Appl Immunol**. v. 66, p. 200-207, 1981.

ISRAELSKI, DM; ARAUJO, FG; CONLEY, FK; SUZUKI, Y; SHARMA, S; REMINGTON, JS. Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis. **J Immunol**. v. 142, p. 954-958, 1989.

JABARA, HH; FU, SM; GEHA, RS; VERCELLI, D. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. **J Exp Med**. v. 172, p. 1861-1864, 1990.

JACOBS, L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **J.Parasitol**. v. 46, p. 11-21, 1960.

JACOBS, D; VERCAMMEN, M; SAMAN, E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. **Clin Diagn Lab Immunol**. v. 6, p. 24-29, 1999.

JENUM, PA; STRAY-PEDERSEN, B; GUNDERSEN, AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **J Clin Microbiol**. v. 35, p. 1972-1977, 1997.

JOHNSON, AM; MCDONALD, PJ; NEOH, SH. Monoclonal antibodies to Toxoplasma cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. **J Protozool**. v. 30, p. 351-356, 1983.

JOHNSON, MW; GREVEN, GM; JAFFE, GJ; SUDHALKAR, H; VINE, AK. Atypical, severe toxoplasmic retinochoroiditis in elderly patients. **Ophthalmology.** v. 104, p. 48-57, 1997.

JONES, JL; LOPEZ, A; WILSON, M; SCHULKIN, J; GIBBS, R. Congenital Toxoplasmosis: a review. **Obstet Gynecol Surv**. v. 56, p. 296-305, 2001.

JONES, JL; MUCCIOLI, C; BELFORT, R JR; HOLLAND, GN; ROBERTS, JM; SILVEIRA, C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerg Infect Dis**. v. 12, p. 582-587, 2006.

JONES, TC; YEH, S; HIRSCH, JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. **J Exp Med**. v. 136, p. 1157-1172, 1972.

KAPPERUD, G; JENUM, PA; STRAY-PEDERSEN, B. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. **Am J Epidemiol**. v. 144, p. 405–412, 1996.

KASPER, LH; KHAN, IA. Role
of P30 in host immunity and pathogenesis of T. gondii infection. **Res Immunol**. v. 144, p. 45-48, 1993.

KAUFMANN, SH; BLUM, C; YAMAMOTO, S. Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. **Proc Natl Acad Sci**. v. 90, p. 9620-9624, 1993.

KHAN, IA; MATSUURA, T; KASPER, LH. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. **Infect Immun**. v. 62, p. 1639-1642, 1994.

KHAN, A; SU, C; GERMAN, M; STORCH, GA; CLIFFORD, DB; SIBLEY, LD. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **J Clin Microbiol.** v. 43, p. 5881-5887, 2005.

KHAN, A; JORDAN, C; MUCCIOLI, C; VALLOCHI, AL; RIZZO, LV; BELFORT, R JR; VITOR, RW; SILVEIRA, C; SIBLEY, LD. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerg Infect Dis**. v. 12, p. 942-949, 2006.

KOHLER, S; DELWICHE, CF; DENNY, PW; TILNEY, LG; WEBSTER, P; WILSON, RJ; PALMER, JD; ROOS, DS. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. **Science**. v. 275, p. 1485-1489, 1997.

KONG, JT; GRIGG, ME; UYETAKE, L; PARMLEY, S; BOOTHROYD, JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. **J Infect Dis**. v. 187, p. 1484-1495, 2003.

KOU, K; KAWANO, Y; YOSHIZAWA, I; NOMA, T. Analysis and regulation of interferon-gamma production by peripheral blood lymphocytes from patients with bronchial asthma. **Arerugi**, v. 43, p. 482-491, 1994.

KYES, S; HORROCKS, P; NEWBOLD, C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. **Annu Rev Microbiol.** v. 55, p. 673-707, 2001.

LAGACE, J; PELOQUIN, L; KERMANI, P; MONTIE, T. IgG subclass responses to *Pseudomonas aeruginosa* a- and b- type flagellins in patients with cystic fibrosis. **J Med Microbiol**. v. 43, p. 270–276, 1995.

LAPPALAINEN, M; HEDMAN, K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. **Ann Ist Super Sanita**. v. 40, p. 81-88, 2004.

LEHMANN, T; GRAHAM, DH; DAHL, ER; BAHIA-OLIVEIRA, LM; GENNARI, SM; DUBEY, JP. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infect Genet Evol**. v. 4, p. 107-114, 2004.

LEVINE, ND. Tazonomy of Toxoplasma. **J Protozool.** v. 24, p. 36-41, 1997.

LIESENFELD, O; PRESS, C; MONTOYA, JG; GILL, R; ISAAC-RENTON, JL; HEDMAN, K; REMINGTON, JS. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. **J Clin Microbiol**. v. 35, p. 174-178, 1997.

LINDBERG, RE; FRENKEL, JK. Toxoplasmosis in nude mice. **J Parasitol.** v. 63, p. 219-21, 1977.

LINDE, A; HAMMARSTROM, L; SMITH, CI. IgG subclass deficiency and chronic fatigue syndrome. **Lancet.** v. 1, p. 885–886, 1988.

LINDE, A; SODERSTROM, R; SMITH, CI; SALBERG, M; DAHL, H; GRUBB, R; BJORKANDER, J; HAMMARSTROM, L. Herpesvirus serology, aberrant specific immunoglobulin G2 and G3 subclass patterns and Gm allotypes in individuals with low levels of IgG3. **Clin Exp Immunol.** v. 90, p. 199–203, 1992.

LUDER, CG; WALTER, W; BEUERLE, B; MAEURER, MJ; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. **Eur J Immunol**. v. 31, p. 1475-1484, 2001.

LUFT, BJ; REMINGTON, JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clin Infect Dis**. v. 15, p. 211-222, 1992.

LYONS, RE; ANTHONY, JP; FERGUSON, DJP; BYRNE, N; ALEXANDER, J; ROBERTS, F; ROBERTS, CW. Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complx class I and transforming growth factor B and a protective role for interleukin-6. **Infect Immun**. v. 69, p. 2589–2595, 2001.

LYONS, RE; MCLEOD, R; ROBERTS, CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**. v. 18, p. 198-201, 2002.

MASIHI, KN; WERNER, H. The effect of passively transferred heterologous serum on *Toxoplasma gondii* in NMRI mice. Influence of the treatment on course of infection and cyst formation. **Zentralbl Bakteriol**. v. 240, p. 135-142, 1978.

MATTHEWS, JD; WEITER, JJ. Outer retinal toxoplasmosis. **Ophthalmology.** v. 95, p. 941-946, 1988.

MCKEE, AS; DZIERSZINSKI, F; BOES, M; ROOS, DS; PEARCE, EJ. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**. v. 173, p. 2632-2640, 2004.

MCLEOD, R; EISENHAUER, P; MACK, D; BROWN, C; FILICE, G; SPITALNY, G. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**. v. 142, p. 3247-3255, 1989.

MCNEIL, BJ; HANLEY, JA. Statistical approaches to the analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves**. Med Decis Making**. v. 4, p. 137-150, 1984.

MILLER, MA; GRIGG, ME; KREUDER, C; JAMES, ER; MELLI, AC; CROSBIE, PR; JESSUP, DA; BOOTHROYD, JC; BROWNSTEIN, D; CONRAD, PA. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is

common in California sea otters (Enhydra lutris nereis) and is a cause of mortality. **Int J Parasitol.** v. 4, p. 275-284, 2004.

MINEO, JR; CAMARGO, ME; FERREIRA, AW. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infect Immun**. v. 27, p. 283-287, 1980.

MONTOYA, JG; REMINGTON, JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. **Clin Infect Dis**. v. 23, p. 277-282, 1996.

MONTOYA, JG; JORDAN, R; LINGAMNENI, S; BERRY, GJ; REMINGTON, JS. Toxoplasmic myocarditis and polymyositis in patients with acute acquired toxoplasmosis diagnosed during life. **Clin Infect Dis**. v. 24, p. 676-683, 1997.

MONTOYA, JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J Infect Dis**. v. 185(1), p. 73-82, 2002.

MONTOYA, JG; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MOORTHY, RS; SMITH, RE; Rao, NA. Progressive ocular toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Am J Ophthalmol**. v. 115, p. 742-747, 1993.

NAGINENI, CN; PARDHASARADHI, K; MARTINS, MC; DETRICK, B; HOOKS, JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. **Infect Immun**. v. 64, p. 4188-4196, 1996.

NAGINENI, CN; DETRICK, B; HOOKS, JJ. Transforming growth factor-beta expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*, a possible role in the immunopathogenesis of retinochoroiditis. **Clin Exp Immunol**. v. 228, p. 372-378, 2002.

NICHOLSON, DH; WOLCHOK, EB. Ocular toxoplasmosis in an adult receiving long-term corticosteroid therapy. **Arch Ophthalmol**. v. 94, p. 248-254, 1976.

NICOLLE C; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de leishman (ou organisms voisins) de Gondii. **Compt Rend Acad Sci**. v. 147, p. 763-766, 1908.

NUSSENBLATT, RB ; BELFORT, R JR. Ocular toxoplasmosis. An old disease revisited. **JAMA**. v. 271, p. 304-307, 1994.

NUSSENBLATT, RB, WHITCUP, SM; PALESTINE, AG. OCULAR TOXOPLASMOSIS. IN: NUSSENBLATT, RB; WHITCUP, SM; PALESTINE, AG. editors. Uveitis Fundamentals and clinical practice. **St Louis: Mosby Yearbook**. p. 211–28, 1996.

NOWAKOWSKA D, COLON I, REMINGTON JS, GRIGG M, GOLAB E, WILCZYNSKI J, SIBLEY LD. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**. v. 44, p. 1382-1389, 2006.

O'CONNOR, GR. Factors related to the initiation and recurrence of uveitis. XL Edward Jackson memorial lecture. **Am J Ophthalmol**. v. 96, p. 577-599, 1983.

OTTESEN, EA; SKVARIL, F; TRIPATHY, SP; POINDEXTER, RW; HUSSAIN, R. Prominence of IgG4 I the IgG antibody response to human filariasis. **J. Immunol**. v. 134, p. 2707-2712, 1985.

PARMLEY, SF; GROSS, U; SUCHARCZUK, A; WINDECK, T; SGARLATO, GD; REMINGTON, JS. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**. v. 80, p. 293-301, 1994.

PASHLEY, TV; VOLPE, F; PUDNEY, M; HYDE, JE; SIMS, PF; ELVES, CJ. Isolation and molecular characterization of the bifunctional hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase gene from Toxoplasma gondii. **Mol Biochem Parasitol**. v. 86, p. 37-47, 1992.

PAVIA, CS; BITTKER, SJ; CURNICK, KE. Passive immunization protects guinea pigs from lethal Toxoplasma infection. **FEMS Microbiol Immunol**. v. 4, p. 97-104, 1994.

PAVLI, P; HUME, DA; VAN DE POL, E; DOE, WF. Dendritic cells, the major antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. **Immunology**. v. 78, p. 132-141, 1993.

PENA, HF; SOARES, RM; AMAKU, M; DUBEY, JP; GENNARI, SM. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Res Vet Sci**. v. 81, p. 58-67, 2006.

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

PINON, JM; TOUBAS, D; MARX, C; MOUGEOT, G; BONNIN, A; BONHOMME, A; VILLAUME, M; FOUDRINIER, F; LEPAN, H. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**. v. 28, p. 1739-1743, 1990.

PORTELA, RW; BETHONY, J; COSTA, MI; GAZZINELLI, A; VITOR, RW; HERMETO, FM; CORREA-OLIVEIRA, R; GAZZINELLI, RT. A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis, and levels of glycoinositolphospholipid-specific immunoglobulin A. **J Infect Dis**. v. 190, p. 175-183, 2004.

RAMALHO, WM; CAMARGO, NJ; TREVISAN, R; GRACA, RM; DA SILVA, AJ; MOURA, I; DUBEY, JP; GARRETT, DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerg Infect Dis**. v. 12, p. 326-329, 2006.

REHDER, JR; BURNIER, MB JR; PAVESIO, CE; KIM, MK; RIGUEIRO, M; PETRILLI, AM; BELFORT, R JR. Acute unilateral toxoplasmic iridocyclitis in an AIDS patient. **Am J Ophthalmol**. v. 106, p. 740-741, 1988.

REMINGTON, JS; DESMONTS, G. Toxoplasmosis, *In* Remington, JS; & Klein, JO. (ed.), Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 3rd ed. **The W. B. Saunders Co.**, Philadelphia, Pa. p. 89–195, 1990.

REMINGTON, JS; THULLIEZ, P; MONTOYA, JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**. v. 42, p. 941-945, 2004.

RIDEL, PR; AURIAULT, C; DARCY, F; PIERCE, RJ; LEITE, P; SANTORO, F; NEYRINCK, JL; KUSNIERZ, JP; CAPRON, A. Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis. **J Immunol**. v. 141, p. 978-983, 1988.

ROBERTS, A; HEDMAN, K; LUYASU, V, *et al.* Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 20, p. 467-474, 2001.

ROBERTS, F; & MCLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitol Today**. v. 15, p. 51-57, 1999.

ROITT, I; BROSTOFF, J; MALE, D. Imunologia. 5ªed., São Paulo, Ed. Manole, p. 71-80, 1999.

SANTORO, FD; AFCHAIN A; PIERCE, R. Serodiagnosis of Toxoplasma infection using a purified parasite protein (p30). **Clin Exp Immunol**. v. 62, p. 262-269, 1985.

SCHLUTER, D; HEIN, A; DORRIES, R; DECKERT-SCHLUTER, M. Different subsets of T cells in conjunction with natural killer cells, macrophages, and activated microglia participate in the intracerebral immune response to *Toxoplasma gondii* in athymic nude and immunocompetent rats. **Am J Pathol**. v. 146, p. 999-1007, 1995.

SEABRA, SH; DE SOUZA, W; DAMATTA, RA. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages**. Exp Parasitol**. v. 100, p. 62-70, 2002.

SHARMA, SD; ARAUJO, FG; REMINGTON, JS. Toxoplasma antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**. v. 133, p. 2818-2820, 1984.

SHEFFIELD, HG, MELTON, ML. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**. v. 54, p. 209-226, 1968.

SIBLEY, LD; BOOTHROYD, JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**. v. 359, p. 825, 1992.

SIBLEY, LD; BOOTHROYD, JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**. v. 3, p. 82-95, 1992.

SIBLEY, LD; MORDUE, D; HOWE, DK. Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. **Immunobiology**. v. 201, p. 210-224, 1999.

SILVEIRA, C; BELFORT, R JR; BURNIER, M JR; NUSSENBLATT, R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. **Am J Ophthalmol**. v. 106, p. 362-364, 1988.

SILVEIRA, C; BELFORT, R JR; MUCCIOLI, C; ABREU, MT; MARTINS, MC; VICTORA, C; NUSSENBLATT, RB; HOLLAND, GN. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. **Am J Ophthalmol**. v. 131, p. 351-354, 2001.

SILVEIRA, C; BELFORT, R JR; MUCCIOLI, C; *et al*, The effect of long-term intermittent trimethoprim/sulfamethoxazole treatment on recurrences of toxoplasmic retinochoroiditis. **Am J Ophthalmol**. v. 134, p. 41-46, 2002.

SILVEIRA, C; FERREIRA, R; MUCCIOLI, C; NUSSENBLATT, R; BELFORT, R JR. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **Am J Ophthalmol**. v. 136, p. 370-371, 2003.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli: incontrato nell lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uommo. **Rev Soc Sci São Paulo**. v. 3, p. 109-112, 1908.

STEINBERG, AG; MORELL, A; SKVARIL, F; LOGHEM, EV: The effect of Gm(23) on the concentration of IgG2 and IgG4 in normal human serum. **J Immunol.** v. 110, p. 1642– 1645, 1973.

STEPICK-BIEK, P; THULLIEZ, P; ARAUJO, FG; REMINGTON, JS. IGA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. **J. Infect. Dis**. v. 162, p. 270–273, 1990.

STRAY-PEDERSEN, B. Treatment of toxoplasmosis in the pregnant mother and newborn child. **Scand J Infect Dis**. v. 84, p. 23-31, 1992.

SU, C; HOWE, DK; DUBEY, JP; AJIOKA, JW; SIBLEY, LD. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci**. v. 99, p. 10753-10758, 2002.

SUBAUSTE, CS; REMINGTON, JS. Immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr Opin Immunol**. v. 5, p. 532, 1993.

SUBAUSTE, CS; deWALL; MALEFYT, R; FUH, F. Role of CD80 (B7.1) and CD86 (b7.2) in the immune response toa n intracellular pathogen. **J. Immunol**. v. 160, p. 1831, 1998.

SUBAUSTE, CS; WESSENDARP, M; SORENSEN, RU; LEIVA, LE. CD40-CD40 ligand interaction is central to cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii*, patients with hyper IgM syndrome have a defective type 1 immune response that can be restored by soluble CD40 ligand trimer. **J Immunol**. v. 162,p. 6690-6700, 1999.

SUBAUSTE, CS; WESSENDARP, M. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation alter infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and –independent T cell production of IFN-γ. **J Immunol**. v. 165,p. 1498-1505, 2000.

SUZUKI, Y; KOBAYASHI, A. Suppression of unprimed T and B cells in antibody responses by irradiation-resistant and plastic-adherent suppressor cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Infect Immun**. v. 40, p. 1-7, 1983.

SUZUKI, Y; REMINGTON, JS. The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. **J Immunol**. v. 144, p. 1954-1956, 1990.

SUZUKI, Y; YANG, Q; YANG, S; NGUYEN, N; LIM, S; LIESENFELD, O; KOJIMA, T; REMINGTON, JS. IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis. **J Immunol**. v. 157, p. 2564-2569, 1996.

TENTER, AM; HECKEROTH, AR; WEISS, LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**. v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TENTER, AM; HECKEROTH, AR; WEISS, LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol.** v. 30, p. 1217-58, 2000. Review. Erratum in: **Int J Parasitol**. v. 31, p. 217-220, 2001.

TURUNEN, H; VUORIO, KA; LEINIKKI, PO. Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Scand J Infect Dis**. v. 15, p. 307–311, 1983.

VALLOCHI, AL; NAKAMURA, MV; SCHLENSINGER, D; MARTINS, M; SILVEIRA C; BELFORT, JR C; RIZZO, LV. Ocular Toxoplasmosis: More Than Just What Meets the Eye. **Scand J. Immunol**. v. 55, p. 324-328, 2002.

VALLOCHI, AL; MUCCIOLI, C; MARTINS, MC; SILVEIRA, C; BELFORT, R JR; RIZZO, LV. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am J Ophthalmol**. v. 139, p. 350-351, 2005a.

VALLOCHI, AL; DA SILVA RIOS, L; NAKAMURA, MV; SILVEIRA, C; MUCCIOLI, C; MARTINS, MC; BELFORT, R JR; RIZZO, LV. The involvement of autoimmunity against retinal antigens in determining disease severity in toxoplasmosis. **J Autoimmun**. v. 24(1), p. 25-32, 2005b.

VIETZKE, WM; GELDERMAN, AH; GRIMLEY, PM; VALSAMIS, MP. Toxoplasmosis complicating malignancy. Experience at the National Cancer Institute. **Cancer**. v. 21, p. 816-827, 1968.

VILLENA, D; AUBERT, V; BRODARD, C; QUEREUX, B; LEROUX, D; DUPOUY, G; REMY, F; FOUDRINIER, C; CHEMLA, JE; GOMEZ-MARIN, PINON, JM. Detection of Specific Immunoglobulin E during Maternal, Fetal, and Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 3487–3490, 1999.

WALDREP JC, SCHULTE JR. Characterization of human IgG subclasses within intraocular compartments. **Reg Immunol**. v. 2 p,22-32, 1989.

WALLACH, J. Interpretation of diagnostic tests, 6th ed. Bostons: Little Brown & Co, 1996.

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.** v. 31, p. 2952-1959, 1993.

WONG, SY; REMINGTON, JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**. v. 7, p. 299-316, 1993.

WONG, SY; REMINGTON, JS. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clin Infect Dis**. v. 18, p. 853-861, 1994.

YAMAMOTO, JH; VALLOCHI, AL; SILVEIRA, C; FILHO, J; NUSSENBLATT, K; CUNHA-NETO, RB; GAZZINELLI, AE; BELFORT, JR RT; RIZZO, LV. Discrimination between Pacients with Acquired Toxoplasmosis and Congenital Toxoplasmosis on the Basis of the Immune Response to Parasite Antigens. **J Infect Dis**. v. 181, p. 2018-2022, 2000.

YANG, P; DAS, PK; KIJLSTRA, A. Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. **Ocul Immunol Inflamm**. v. 8, p. 149-157, 2000.

YAP, GS; SHER, A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. **Immunobiology**. v. 201, p. 240-247, 1999.

.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

GRUPO EXPERIMENTAL

ESTUDO: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL AO *Toxoplasma gondii,* SUA RESISTÊNCIA À SULFA E ASSOCIAÇÃO À FORMA CLÍNICA DA DOENÇA

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, (nome e profissão)....., residente e domiciliado na ....., portador da Cédula de identidade, RG ..... , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em _____ / _____ /_____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "Caracterização da resposta humoral ao *Toxoplasma gondii,* sua resistência à sulfa e associação à forma clínica da doença" . Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

O principal objetivo deste estudo é estudar a imunidade (defesas do organismo) contra o parasita *Toxoplasma gondii*, que está presente em diversas carnes e que pode ser o causador da doença ocular. Você está sendo convidado a participar deste estudo, pois apresenta problemas no olho devido ao *Toxoplasma.* Visamos estabelecer a relação entre a produção de anticorpos (proteínas de defesa do organismo) e as várias formas clínicas da toxoplasmose, além de procurarmos definir as características do parasita que fazem com que haja falha no tratamento com a sulfadiazina, permitindo assim um melhor entendimento para o tratamento ideal da doença.

Estou ciente que:

I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada ***"toxoplasmose ocular***";

II) Serão realizados:

a) exame oftalmológico completo que consistirá de um exame externo do olho, medida da pressão intra-ocular e exame de fundo de olho. Este exame faz parte da rotina numa consulta oftalmológica.

b) exame de sangue consistirá de não mais de 450 ml de sangue a serem extraídos em um período de vários meses, sendo que cada amostra será de não mais de 50 ml. Os riscos da retirada de sangue são hematoma local (rouxidão), algum desconforto e, raramente, tontura.

III) Essa(s) coleta(s) será(ao) feita(s) apenas para este estudo e em nada influenciará (influenciarão) o meu tratamento; não vai (vão) me curar; não vai (vão) me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue). Os riscos na coleta de humor vítreo (líquido contido no olho) são os próprios da própria cirurgia. Todos os procedimentos para a coleta deste material estão normalmente incluídos nas etapas da cirurgia. A diferença é que o material será coletado em recipiente próprio para a sua análise. Assim, não há riscos introduzidos pela coleta do material.

IV) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo ;

V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Estes estudos podem melhorar o entendimento da doença levando a formas mais eficazes de diagnóstico e tratamento no futuro. É provável que o voluntário em questão não seja beneficiário direto destes avanços.

A adoção de alguns cuidados específicos para prevenção da toxoplasmose é vantajosa para você. Estes cuidados consistem em: ingestão de carnes cozidas ou bem passadas, leite pasteurizado e fervido, água filtrada e tratada, lavagem de verduras e frutas, bem como evitar a criação de gatos, o hospedeiro definitivo da toxoplasmose.

Quaisquer dúvidas, que possam ocorrer com relação a esse estudo, poderão ser contatados: Dr. Cláudio Silveira na Clínica Silveira, Avenida sete de setembro, 1502 Erechim – RS, telefone (54) 321-1900. Dr. Luiz Vicente Rizzo na Universidade de São Paulo, Laboratório de Imunologia Clínica, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo –SP 05508-900, telefone (11) 3091 7394.

São Paulo, de de 200 .

( ) Paciente / ( ) Responsável

.....

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____
Lília Rios Tsukuda

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
GRUPO CONTROLE

ESTUDO: **CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL AO *Toxoplasma gondii*, SUA RESISTÊNCIA À SULFA E ASSOCIAÇÃO À FORMA CLÍNICA DA DOENÇA**

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, (nome e profissão)....., residente e domiciliado a ....., portador da Cédula de identidade, RG ..... , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em ___ /____/___ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "Caracterização da resposta humoral ao *Toxoplasma gondii,* sua resistência à sulfadiazina e associação à forma clínica da doença". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

O principal objetivo deste estudo é estudar a imunidade (defesas do organismo) contra o parasita *Toxoplasma gondii*, que está presente em diversas carnes e que pode ser o causador da doença ocular. Você está sendo convidado a participar deste estudo, pois apresenta problemas no olho devido ao *Toxoplasma.* Visamos estabelecer a relação entre a produção de anticorpos (proteínas de defesa do organismo) e as várias formas clínicas da toxoplasmose, além de procurarmos definir as características do parasita que fazem com que haja falha no tratamento com a sulfadiazina, permitindo assim um melhor entendimento para o tratamento ideal da doença.

Estou ciente que:

IX) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada ***"toxoplasmose ocular***";

X) Serão realizados:

c) exame oftalmológico completo que consistirá de um exame externo do olho, medida da pressão intra-ocular e exame de fundo de olho. Este exame faz parte da rotina numa consulta oftalmológica.

d) exame de sangue consistirá de não mais de 450 ml de sangue a serem extraídos em um período de vários meses, sendo que cada amostra será de não mais de 50 ml. Os riscos da retirada de sangue são hematoma local (rouxidão), algum desconforto e, raramente, tontura.

e) APENAS para indivíduos com problemas no olho, mas não devido ao *Toxoplasma:* análise do líquido que está contido no olho (humor vítreo), que normalmente seria desprezado durante a cirurgia (se esta for necessária) para correção de complicações da doença ocular, como descolamento de retina, glaucoma, catarata.

XI) Essa(s) coleta(s) será(ao) feita(s) apenas para este estudo e, para os indivíduos com problemas no olho, mas não devido ao *Toxoplasma,* em nada influenciará (influenciarão) o meu tratamento; não vai (vão) me curar; não vai (vão) me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue). Os riscos na coleta de humor vítreo (líquido contido no olho) são os próprios da própria cirurgia. Todos os procedimentos para a coleta deste material estão normalmente incluídos nas etapas da cirurgia. A diferença é que o material será coletado

em recipiente próprio para a sua análise. Assim, não há riscos introduzidos pela coleta do material.

XII) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo ;

XIII) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

XIV) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médicos;

XV) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

XVI) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Estes estudos podem melhorar o entendimento da doença levando a formas mais eficazes de diagnóstico e tratamento no futuro. É provável que o voluntário em questão não seja beneficiário direto destes avanços.

A adoção de alguns cuidados específicos para prevenção da toxoplasmose é vantajosa para você. Estes cuidados consistem em: ingestão de carnes cozidas ou bem passadas, leite pasteurizado e fervido, água filtrada e tratada, lavagem de verduras e frutas, bem como evitar a criação de gatos, o hospedeiro definitivo da toxoplasmose.

Quaisquer dúvidas, que possam ocorrer com relação a esse estudo, poderão ser contatados:

Dr. Cláudio Silveira na Clínica Silveira, Av. Sete de setembro, 1502 Erechim – RS, telefone (54) 321-1900. Dr. Luiz Vicente Rizzo na Universidade de São Paulo, Laboratório de Imunologia Clínica, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo –SP 05508-900, telefone (11) 3091 7394.

São Paulo, de de 200 .

( ) Paciente .....

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____
Lília Rios tsukuda

ANEXO B

Quadro II - Resumo dos dados coletados e obtidos na população estudada oredenados por grupo clínico

Nº	Sexo	Idade	Data	Grupo	Evolução	Isótipos				IgG subclasses					Peptídeos					Sorotipo
		(anos)	Coleta	Clínico	Clínica	IgG	IgM	IgA	IgE	1	2	3	4	I.A.	6I/III	d6I/III	6II	d6II	7II	
257	M	5	jan-99	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
11	F	25	ago-02	IgM sem TO																Atp. D
15	F	27	ago-02	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. D
132	M	10	abr-03	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
156	F	12	set-03	IgM sem TO																Atp. D
305	F	13	mar-05	IgM sem TO																Atp. D
310	M	17	mar-05	IgM sem TO																Atp. A
312	M	44	abr-05	IgM sem TO	TO branda															
313	F	23	mai-05	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
324	F	14	abr-05	IgM sem TO																I/III
331	F	31	20/0405	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
334	F	58	mai-05	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
336	F	11	out-04	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
338	F	41	fev-05	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
348	F	27	abr-05	IgM sem TO	TO grave															Atp. D
349	F	38	abr-05	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. D
69	M	15	fev-03	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. A
114	F	25	dez-02	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. C
204	F	16	mar-04	IgM sem TO	SP sem TO															
188	F	39	nov-03	IgM sem TO	SP sem TO															
154	M	43	set-03	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. B
219	M	24	jun-04	IgM sem TO	SP sem TO															
178	F	37	jun-05	IgM sem TO	TO branda															
30	F	21	fev-03	IgM sem TO	SP sem TO															II
208	M	11	mar-04	IgM sem TO	SP sem TO															
72	F	32	mar-03	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
125	F	57	mar-03	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. C
68	M	32	fev-03	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. A
6	M	16	jul-02	IgM sem TO	SP sem TO															II
74	M	38	nov-02	IgM sem TO	TO grave															Atp. D
150	M	17	ago-03	IgM sem TO	TO branda															Atp. D
197	M	19	fev-04	IgM sem TO	SP sem TO															
221	M	29	jun-04	IgM sem TO	SP sem TO															
181	F	26	out-03	IgM sem TO																
120	M	34	abr-03	IgM sem TO	TO branda															II
299	M	34	mar-05	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
164	F	24	set-03	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
8	M	18	jun-05	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
258	F	10	jan-99	IgM sem TO	TO branda															Atp. B
14	F	25	ago-02	IgM sem TO	TO branda															Atp. B
259	F	38	jan-99	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
141	M	14	jul-03	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
2	M	35	abr-02	IgM sem TO	TO branda															Atp. C
128	F	41	mar-03	IgM sem TO	TO branda															I/III
146	M	35	ago-03	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. A
18	M	16	set-02	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
300	F	27	mar-05	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
285	F	50	mai-04	IgM sem TO	SP sem TO															Atp. A
26	M	15	out-02	IgM sem TO	TO grave															Atp. D
283	M	44	mar-04	IgM sem TO	TO grave															Atp. D
143	M	7	jul-03	IgM sem TO	SP sem TO															II
9	M	29	abr-02	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
67	M	26	fev-03	IgM sem TO	SP sem TO															I/III
191	M	12	fev-04	IgM sem TO	SP sem TO															
87	F	50	jul-03	IgM sem TO	TO branda															I/III

ANEXO B

168	F	35	set-03	IgM sem TO	SP sem TO														Atp. C
240	F	59	jan-05	SP sem TO															Atp. B
315	M	8	mai-05	SP sem TO															I/III
351	M	44	abr-05	SP sem TO															Atp. D
355	F	19	jun-05	SP sem TO															Atp. D
360	F	47	jun-05	SP sem TO															Atp. A
368	F	30	jun-05	SP sem TO															II
372	F	30	jun-05	SP sem TO															I/III
374	M	11	jun-05	SP sem TO															Atp. C
376	F	24	jun-05	SP sem TO															Atp. D
384	F	24	jun-05	SP sem TO															Atp. D
290	F	12	jan-05	SP sem TO															I/III
287	F	17	fev-05	SP sem TO															Atp. D
298	F	25	mar-05	SP sem TO															I/III
281	F	30	jul-03	SP sem TO															I/III
303	F	60	mar-05	SP sem TO															Atp. D
292	F	30	fev-05	SP sem TO															Atp. D
295	F	42	fev-05	SP sem TO															II
262	F	34	jan-99	SP sem TO															Atp. C
291	F	22	fev-05	SP sem TO															II
79	F	25	abr-03	SP sem TO															II
255	F	25	dez-98	SP sem TO															Atp. D
175	F	42	nov-04	SP sem TO															
288	F	39	fev-05	SP sem TO															Atp. D
260	F	66	jan-99	SP sem TO															
167	F	27	set-03	SP sem TO	SP sem TO														Atipico B
293	M	10	fev-05	SP sem TO															Atp. D
266	F		mar-99	SP sem TO															I/III
119	F	18	abr-03	SP sem TO															Atp. D
133	M	17	abr-03	SP sem TO															I/III
263	F	30	fev-99	SP sem TO															Atp. D
73	F	34	fev-03	SP sem TO															II
210	M	12	mar-04	SP sem TO															
180	F	41	nov-04	SP sem TO															
215	F	31	mar-04	SP sem TO															
65	M	20	mar-03	SP sem TO															I/III
3	F	48	abr-02	SP sem TO															Atp. D
58	M	25	fev-03	SP sem TO															II
296	F	19	fev-05	SP sem TO															Atp. D
77	F	48	dez-02	SP sem TO															Atp. D
199	F	32	fev-04	SP sem TO															
34	F	13	out-02	SP sem TO															Atp. D
200	F	32	fev-04	SP sem TO															
177	F	30	out-03	SP sem TO															
301	F	37	mar-05	SP sem TO															II
151	M	5	ago-03	SP sem TO															
60	M	42	fev-03	SP sem TO															Atp. D
25	F	30	out-02	SP sem TO	SP sem TO														I/III
152	M	21	ago-03	SP sem TO															Atp. D
129	M	7	mai-03	SP sem TO	SP sem TO														Atp. B
286	F	46	fev-05	SP sem TO															Atp. D
159	M	10	set-03	IgM com TO	TO branda														Atp. D
236	M	44	dez-04	IgM com TO	TO grave														Atp. D
250	M	11	mar-05	IgM com TO	TO branda														Atp. A
311	M	45	mar-05	IgM com TO	TO grave														Atp. D
314	M	16	mai-05	IgM com TO	TO branda														II
317	F	37	abr-05	IgM com TO															Atp. D
377	F	21	jun-05	IgM com TO															Atp. C

ANEXO B

378	F	48	jun-05	IgM com TO	TO branda														I/III
5	M	36	jul-02	IgM com TO	TO grave														II
38	F	46	fev-03	IgM com TO	TO branda														Atp. D
176	M	54	out-03	IgM com TO	TO grave														
162	F	33	set-03	IgM com TO	TO grave														Atp. D
20	F	31	set-02	IgM com TO	TO grave														Atp. C
134	F	31	abr-03	IgM com TO	TO grave														Atp. D
130	M	35	mai-03	IgM com TO	TO branda														I/III
17	F	43	set-02	IgM com TO	TO branda														II
112	M	48	out-02	IgM com TO	TO branda														I/III
270	F	51	ago-01	IgM com TO	TO grave														Atp. A
277	F	14	out-02	IgM com TO	TO grave														Atp. B
306	M	52	mar-05	IgM com TO	TO grave														II
243	M	33	jan-05	TO branda															I/III
251	M	31	abr-97	TO branda															I/III
319	F	28	mai-05	TO branda															II
340	M	26	mai-05	TO branda															Atp. D
344	M	17	mai-05	TO branda															Atp. D
347	M	24	mai-05	TO branda															Atp. D
362	M	37	jun-05	TO branda															Atp. D
363	M	28	jun-05	TO branda															Atp. D
364	M	18	jun-05	TO branda															II
370	M	27	jun-05	TO branda															II
382	M	42	jun-05	TO branda															Atp. D
88	F	17	jul-03	TO branda															I/III
148	F	29	ago-03	TO branda															I/III
75	M	38	fev-03	TO branda															I/III
158	M	29	set-03	TO branda															Atp. D
230	F	45	nov-04	TO branda															Atp. C
85	F	44	out-02	TO branda															II
45	F	34	fev-03	TO branda															Atp. A
59	M	20	fev-03	TO branda															Atp. D
183	F	41	out-05	TO branda															
50	M	17	fev-03	TO branda															I/III
224	F	29	jul-04	TO branda															Atp. D
116	M	55	out-02	TO branda	TO branda														II
173	F	15	out-03	TO branda															
24	F	32	out-02	TO branda	TO grave														Atp. D
179	M	29	out-03	TO branda															
163	M	26	set-03	TO branda															Atp. D
142	M	33	jul-03	TO grave	TO grave														I/III
237	M	33	jan-05	TO grave															Atp. D
238	M	21	mai-03	TO grave	TO grave														Atp. D
241	F	39	jan-05	TO grave	TO grave														Atp. C
244	F	42	ago-05	TO grave															II
246	M	29	ago-03	TO grave															Atp. D
247	F	31	mar-05	TO grave															I/III
248	F	12	mar-03	TO grave															Atp. D
249	M	21	mar-05	TO grave															Atp. D
252	M	36	mar-05	TO grave															Atp. C
316	M	18	mai-05	TO grave															Atp. D
318	M	15	mai-05	TO grave															Atp. C
320	M	16	abr-05	TO grave															II
321	M	18	mai-05	TO grave															Atp. D
322	M	17	abr-05	TO grave															Atp. D
323	M	17	abr-05	TO grave															II
325	F	12	mai-05	TO grave															Atp. D
326	F	28	mai-05	TO grave															Atp. C

ANEXO B

327	M	50	mai-05	TO grave															Atp. C
328	F	18	mar-04	TO grave															Atp. D
329	M	56	abr-05	TO grave															II
330	M	38	mai-05	TO grave															Atp. D
332	M	25	mai-05	TO grave															I/III
337	M	34	jun-03	TO grave															Atp. C
339	F	22	abr-05	TO grave															Atp. D
341	F	12	mai-05	TO grave															Atp. C
345	F	29	mar-05	TO grave															Atp. D
346	F	20	mai-05	TO grave															Atp. D
350	M	40	abr-05	TO grave															Atp. D
352	F	44	mai-05	TO grave															Atp. D
353	M	17	jun-05	TO grave															II
356	F	9	jun-05	TO grave															I/III
357	F	58	jun-05	TO grave															I/III
359	M	39	jun-05	TO grave															Atp. C
361	M	48	jun-05	TO grave															Atp. C
365	F	26	jun-05	TO grave															Atp. D
366	M	27	jun-05	TO grave															Atp. D
367	M	17	jun-05	TO grave															Atp. C
369	F	45	jun-05	TO grave															Atp. D
371	F	53	jun-05	TO grave															Atp. D
379	F	4	jun-05	TO grave															Atp. D
380	F	23	jun-05	TO grave															Atp. B
381	F	40	jun-05	TO grave															Atp. D
123	F	50	abr-03	TO grave															I/III
276	M	31	out-02	TO grave															Atp. D
268	M	15	dez-00	TO grave	TO grave														II
254	M	23	dez-98	TO grave															Atp. D
282	M	39	mar-04	TO grave															Atp. D
273	M	23	jul-02	TO grave															II
121	M	16	abr-03	TO grave															Atp. D
122	M	33	mar-03	TO grave															Atp. D
269	F	14	mai-01	TO grave															Atp. D
274	F		jul-02	TO grave															**I/III**
308	M	36	mar-05	TO grave															Atp. C
265	F	43	mar-99	TO grave															Atp. D
275	F	27	jul-02	TO grave	TO grave														I/III
279	M	31	mai-03	TO grave	TO grave														II
302	M	14	mar-05	TO grave															Atp. D
264	F	30	mar-99	TO grave	TO grave														Atp. D
43	F	19	fev-03	TO grave															I/III
64	M	20	mar-03	TO grave															Atp. D
231	F	16	nov-04	TO grave															Atp. D
256	M	14	jan-99	TO grave															II
144	M	19	ago-03	TO grave															II
39	M	24	fev-03	TO grave															Atp. D
220	M	29	jun-04	TO grave															
198	M	46	fev-04	TO grave															
271	M	27	out-01	TO grave															Atp. D
209	M	15	mar-04	TO grave															
46	M	32	fev-03	TO grave															Atp. D
61	M	35	fev-03	TO grave															I/III
174	M	34	out-03	TO grave															
226	M	37	nov-04	TO grave															I/III
203	F	34	mar-04	TO grave															
211	F	30	mar-04	TO grave															
206	M	16	mar-04	TO grave															

ANEXO B

157	M	20	set-03	TO grave															Atp. D
184	M	43	out-03	TO grave															
145	F	14	ago-03	TO grave															Atp. D
171	F	51	out-03	TO grave															
62	F	17	mar-03	TO grave															Atp. D
212	M	35	mar-04	TO grave															
33	F	43	out-02	TO grave															Atp. D
229	F	37	nov-04	TO grave															Atp. D
205	F	59	mar-04	TO grave															
222	F	20	jul-04	TO grave															
82	M	28	mai-03	TO grave															Atp. D
228	F	38	nov-04	TO grave															Atp. C
31	F	27	out-02	TO grave															Atp. D
136	M	50	abr-03	TO grave															I/III
202	M	43	mar-04	TO grave															
16	M	22	set-02	TO grave															Atp. C
81	F	57	mai-03	TO grave	TO grave														Atp. D
76	M	17	dez-02	TO grave															II
115	M	31	nov-02	TO grave															Atp. D
207	F	47	mar-04	TO grave															
194	M	19	fev-04	TO grave															
47	F	34	fev-03	TO grave															Atp. D
49	F	18	fev-03	TO grave															Atp. D
57	M	12	fev-03	TO grave															Atp. D
155	M	32	set-03	TO grave															Atp. D
70	M	38	fev-03	TO grave															Atp. D
187	M	41	nov-04	TO grave															
284	F	53	abr-04	TO grave															Atp. A
54	M	58	fev-03	TO grave															Atp. D
53	F	26	fev-03	TO grave															Atp. D
166	M	40	set-03	TO grave															Atp. D
172	F	39	out-03	TO grave															
160	M	28	set-03	TO grave															II
161	M	39	set-03	TO grave															Atp. D
309	F	12	mar-05	TO grave															Atp. D
44	F	15	fev-03	TO grave															I/III
1	M	35	abr-02	TO grave															Atp. D
41	M	59	fev-03	TO grave	TO grave														
80	M	67	mar-03	TO grave	TO grave														Atp. D
124	M	9	abr-03	TO grave															Atp. D
196	F	58	fev-04	TO grave															
289	M	**16**	fev-05	TO grave															Atp. D

Abreviaturas: I.A.: índice de avidez de IgG; M: masculino; F: feminino; TO: toxoplasmose ocular; SP: soropositivo; Atp.: Atípico

Reagente
Não reagente
Não testado
Alta avidez
Baixa avidez
Reagente (>1,5)
Não reagente (<1,5)

Anexo C

Definição dos valores do corte (cut off para o ELISA dos isótipos)

A **Tabela V** mostra os dados da análise estatística realizada com os valores em densidade ótica obtidos do plasma de voluntários soronegativos obtidos a partir da pesquisa dos isótipos (IgG1-4) anti-*T.gondii* pela técnica de ELISA indireta. A média e o desvio padrão da densidade ótica do plasma de 40 voluntários em cada teste foram obtidos e utilizados como referência para a definição dos valores de corte (*cut off)* de cada teste. O cut-off foi determinado pela média mais duas vezes o desvio padrão de cada parâmetro. Para melhor visualização dos valores considerados negativos e positivos o valor de corte de cada teste está representado nos gráficos como uma linha pontilhada (**Figura 7**).

Tabela V – Definição de *cut off*. Valores de Média, desvio padrão, valor mínimo, mediana, valor máximo da densidade ótica de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii* obtidas pelo teste ELISA em amostras de plasma de voluntários soronegativos utilizados para a definição do *cut off* de isótipo.

	Isótipos			
	IgG1	**IgG2**	**IgG3**	**IgG4**
Parâmetros estatísticos	**Densidade ótica (D.O.)**			
n	40	40	40	40
Média	0,30	0,52	0,51	0,38
Desvio Padrão (SD)	0,10	0,16	0,16	0,20
Valor mínimo	0,10	0,11	0,04	0,20
Mediana	0,28	0,57	0,43	0,53
Valor máximo	0,49	0,90	0,89	0,86
Cut- off *	**0,50**	**0,84**	**0,83**	**0,78**

**Cut- off* = Média+ 2 x DP

Anexo D

Definição do valor de corte em reposta a cada um dos peptídeos específicos das diferentes cepas do T. gondii

Para definição do valor do *cut-off* avaliamos amostras de 35 indivíduos soronegativos provenientes da cidade de Erechim- RS- Brasil. Cada amostra foi analisada 3 vezes pelo método ELISA, contra os peptídeos 6I/III, d6I/III, 6II, d6II, 7II, CTRL, PE e SAG1, descritos na Quadro I. Para obtenção do valor de corte (cut-off), foi estabelecida a média da densidade óptica obtida em todas as amostras na presença de cada peptídeo somado a duas vezes o desvio padrão . Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela VI**.

Tabela VI. Definição do valor de cut off para cada peptídeo analisado.

Peptídeos	6I/III	d6I/III	6II	d6II	7II	SAG1
Media	1.0	1.0	1.0	1.1	0.9	1.2
Desvio Padrão	0.25	0.25	0.25	0.34	0.20	0.40
Media + DP	**1.23**	**1.26**	**1.23**	**1.35**	**1.14**	**1.59**
Media + 2DP	**1.47**	**1.51**	**1.48**	**1.66**	**1.34**	**2.0**
Cut-off	**1.5**	**1.5**	**1.5**	**1.8**	**1.3**	**2.0**

Abreviações: Desvio Padrão, DP

Anexo E

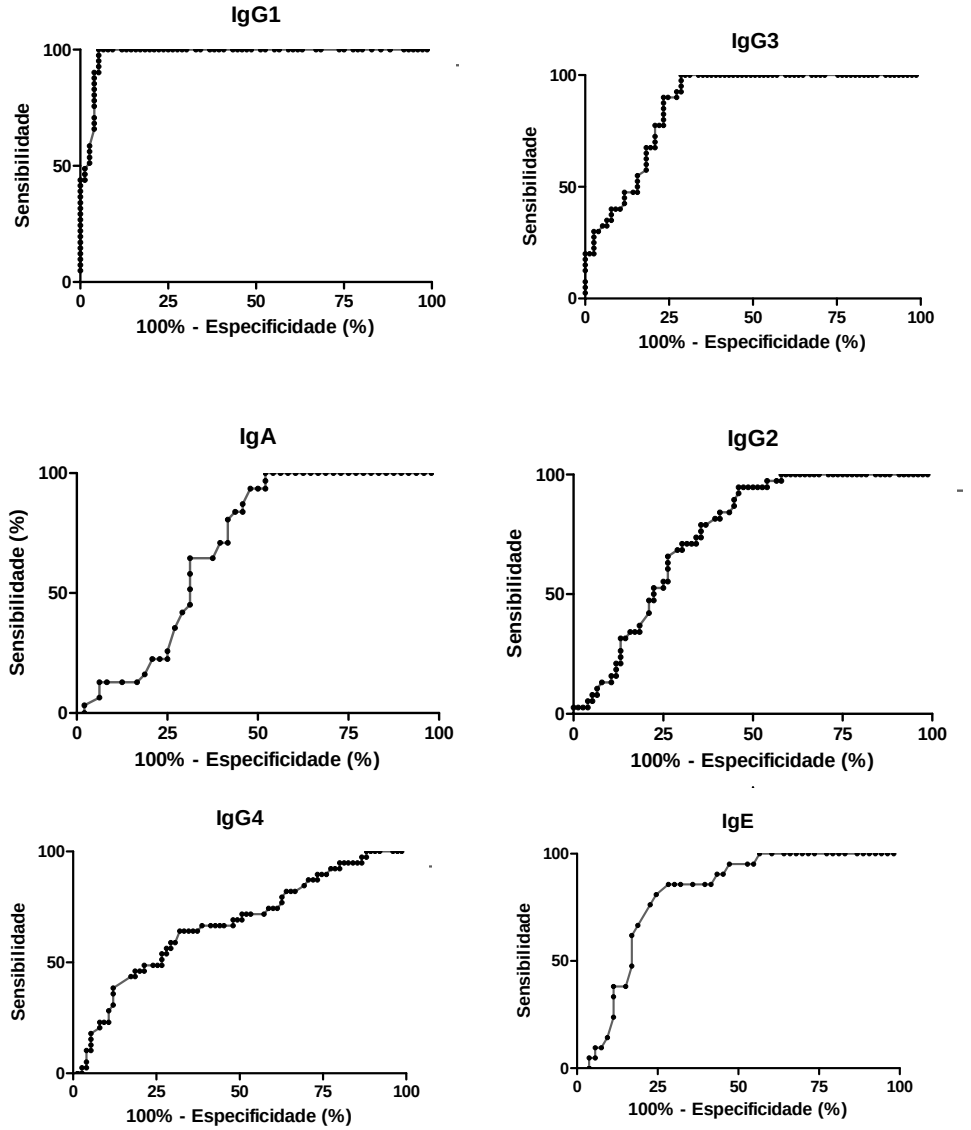


Figura 14 - Representaçãp gráfica da análise por curva ROC dos isótipos anti- *T. gondii* no plasma de indivíduos soronegativos (negativos) e IgM^+ sem lesão ocular (positivos).

TABELA VII – Análise dos valores de corte (cut-off) para cada isótipo específico em função da curva ROC.

Isótipos anti- *T. gondii*	n		cut-off	AUC	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	*p*
	Con.	Pat.					
IgG1	40	46	0,50	0,97	95	98	0,0001
IgG2	40	46	0,80	0,75	48	95	0,0001
IgG3	40	46	0,80	0,89	25	95	0,0001
IgG4	40	46	0,70	0,67	35	94	0.001
IgA	35	35	1,0	0,69	48	100	0,003
IgE	35	35	1,0	0,80	24	100	0.0001

Abreviações: Con.: controles; Pat.: pacientes; AUC: área sobre a curva ROC; *p*: probabilidade (significante $p < 0,05$)

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo